

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

IMPACT DE L'EGCG SUR LA RÉPONSE À LA SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE DANS
UN MODÈLE DE DIFFÉRENCIATION DE CELLULES PROMYELOMONOCYTAIRES
HL-60 EN MACROPHAGES

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOCHIMIE

PAR
RIMA CHOKOR

OCTOBRE 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522-Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que « conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire. »

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier très chaleureusement mon directeur de recherche le Dr Borhane Annabi pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour sa confiance, ainsi que pour son aide et son support durant mon parcours académique.

Je tiens à remercier la Dre Sylvie Lamy et Julie Poirier pour leurs aides et leurs conseils. Merci à tous mes collègues de laboratoire : Arwa Ben Saad, Paula Liana Moldovan, Amélie Vézina, Amira Ouanouki, Hana Ikram Benenemissi, Michel Desjarlais, Jonathan Pratt, et Alain Zgheib pour m'avoir aidé autant sur le côté technique que sur le côté théorique de la recherche.

Un grand merci à mon père, ma mère, mes frères, ma sœur et sa famille qui m'ont encouragée à toujours aller plus loin, et qui m'ont soutenue tout au long de mes études.

J'adresse mes sincères remerciements à mon mari pour son amour inconditionnel, sa patience et son aide. Ceci n'aurait jamais été possible sans lui.

Je tiens finalement à souligner la contribution de la Fondation UQAM pour son soutien financier en m'accordant une bourse du Fonds à l'Accessibilité et à la Réussite des Études (FARE). Je souhaite également remercier la Faculté des Sciences de l'UQAM pour l'octroi de bourses d'exemptions de frais supplémentaires de scolarité.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ	xiii
CHAPITRE I	
INTRODUCTION	1
1.1. Le cancer	1
1.1.1. Généralités.....	1
1.1.2. Statistiques	1
1.1.3. La cancérogenèse	2
1.1.4. L'angiogenèse	4
1.1.4.1. Généralités.....	4
1.1.4.2. L'angiogenèse tumorale	5
1.1.5. Facteurs de croissance	7
1.2. La sphingosine-1-phosphate.....	9
1.2.1. Généralités.....	9
1.2.2. Métabolisme de la sphingosine-1-phosphate.....	10
1.2.3. Les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate	12
1.2.4. Sphingosine-1-phosphate et cancer	15
1.2.5. Voies de signalisation MAPK induites par la sphingosine-1-phosphate	15
1.2.5.1. La voie ERK	16

1.2.5.2. La voie JNK	17
1.2.5.3. La voie P38.....	18
1.3. Le système nerveux central	20
1.3.1. La barrière hémato-encéphalique	20
1.3.2. Neuroinflammation	22
1.3.3. La migration des cellules immunitaires au SNC	22
1.3.4. Les cellules gliales.....	25
1.4. Rapport entre l'alimentation et le cancer	26
1.4.1. Les polyphénols.....	26
1.4.2. Les polyphénols du thé vert.....	27
1.4.3. L'épigallocatechine gallate.....	28
1.5. Modèle cellulaire : Les cellules promyélomonocytaires HL-60	29
CHAPITRE II	
PROJET DE RECHERCHE	32
2.1. Hypothèse et objectifs	32
2.2. Protocole expérimental.....	34
CHAPITRE III	
EGCG INHIBITS S1P2 GENE EXPRESSION AND PREFERENTIALLY ABROGATES SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE-MEDIATED SIGNALING IN UNDIFFERENTIATED HUMAN HL-60 PROMYELOMONOCYTIC LEUKEMIA CELLS.....	35
ABSTRACT.....	36
INTRODUCTION	37
MATERIALS AND METHODS	39
RESULTS	42
DISCUSSION	44
ACKNOWLEDGMENTS	47

FIGURES	48
CHAPITRE IV	
DISCUSSION	54
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	59
RÉFÉRENCES	61

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Les étapes de la cancérogenèse	3
1.2 Les caractéristiques fondamentales du cancer.....	4
1.3 Le processus d'angiogenèse tumorale	6
1.4 Mode d'action des facteurs de croissance	8
1.5 Le métabolisme des sphingolipides.....	11
1.6 Les voies de signalisation associées aux récepteurs de la S1P.....	14
1.7 Schéma simplifié de la voie ERK/MAPK	17
1.8 Schéma simplifié des voies JNK et P38/MAPK	19
1.9 Structure de la barrière hémato-encéphalique	21
1.10 Le processus de la migration des leucocytes vers le SNC	24
1.11 Contenu en catéchines des feuilles de thé vert	27
1.12 Structure moléculaire des catéchines du thé vert	28
1.13 Structure chimique de l'EGCG	29
1.14 Différenciation des cellules HL-60	31
2.1 L'effet de l'EGCG sur les voies de signalisation induites par la S1P à divers stades de la différenciation	33
2.2 Schéma récapitulatif des trois conditions de traitement des cellules HL-60.....	34
3.1 PMA triggers promyelocytic HL-60 cell differentiation into adherent macrophages.....	48
3.2 Macrophage differentiation correlates with significant increases in S1P1, S1P2 and S1P5 gene expression	49

3.3	S1P triggers rapid intracellular signaling through multiple pathways in macrophage-differentiated HL-60 cells.....	50
3.4	EGCG pretreatment of promyelocytic HL-60 inhibits S1P response in macrophage-differentiated HL-60 cells.....	51
3.5	EGCG selectively alters S1P receptor gene expression in macrophage-differentiated HL-60 cells.	52
3.6	Schematic representation of pre-treatment, co-treatment, or post-differentiation cell treatments with EGCG on S1P-mediated signalling pathways.	53
4.1	Les effets anticancéreux de l'EGCG	55
4.2	La différenciation des cellules HL-60 en macrophages par le PMA induit fortement l'expression de PDGF et FGF	60

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

67LR	Récepteur à la laminine de 67 kDa
AC	Adénylate cyclase
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AKT	Protéine kinase B
AMPc	Adénosine monophosphate cyclase
ATF-1	<i>Activating transcription factor</i>
ATP	Adenosine triphosphate
ATRA	Acide tout-trans rétinoïque
bFGF	Facteur de croissance basal des fibroblastes
BHE	Barrière hémato-encéphalique
C1P	Céramide-1-phosphate
Ca ²⁺	Ion calcium
CK	Céramide kinase
CS	Céramide synthase
COX-2	Cyclooxygénase-2
CSBPs	<i>Cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding proteins</i>
DMSO	Diméthylsulfoxyde
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EAN	Névrite auto-immune expérimentale
EC	Épicatéchine
ECG	Épicatéchine gallate
EDG	<i>Endothelial differentiation gene-1</i>
EGC	Épigallocatechine

EGCG	Épigallocatechine gallate
EGF	Facteur de croissance épidermal
EGFR	Récepteur de l'EGF
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FGF	Facteur de croissance fibroblastique
GC	Gallocatechine
GDNF	<i>Glial cell-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Guanidine diphosphate
GPCRs	<i>G protein coupled receptors</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
GTP	Guanidine tris phosphate
IGF	Facteur de croissance homologue à l'insuline
IL-1 β	Interleukine-1 β
IP-10	<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>
JNK	C-Jun N-terminal kinase
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MEC	Matrice extracellulaire
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase</i>
MEKK	<i>Mitogen-activated protein kinase ERK kinase kinase</i>
MIP-1 α	Macrophage inflammatory protein 1 α
MLK3	<i>Mixed lineage kinase-3</i>
MMP	Métalloprotéase matricielle

NF- κ B	Facteur nucléaire de transcription kappa-B
NGF	Facteur de croissance neuronal
NLK	<i>Nemo-Like Kinase</i>
NO	Oxyde nitrique
P38	Protéine 38
PDGF	Facteur de croissance dérivé des plaquettes
PI3K	Phosphatidyl-inositol-3-kinase
PKC	Protéine kinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acétate
Raf	Protéine kinase
Ras	<i>Rat sarcoma proteins</i>
S1P	Sphingosine-1-phosphate
S1P lyase	Sphingosine-1-phosphate lyase
SPP	Sphingosine-1-phosphate phosphatase
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
siRNA	<i>Single interfering RNA</i>
SM synthase	Sphingomyéline synthase
SMase	Sphingomyélinase
SN	Système nerveux
SNC	Système nerveux central
SNP	Système nerveux périphérique
SOS	<i>Son of sevenless</i>
SPHK	Sphingosine kinase
TGF	Facteur de croissance transformant
TGF β	Facteur de croissance transformant β

TNF α	Facteur de nécrose tumorale alpha
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
VEGFR	Récepteur du VEGF

RÉSUMÉ

Les maladies inflammatoires du système nerveux central (SNC) sont caractérisées par l'altération de la barrière hémato-encéphalique induite par les cellules immunitaires et les cellules tumorales. Il est reconnu que les macrophages peuvent induire l'inflammation en infiltrant la BHE. Lors d'un dommage ou d'une infection du SNC, les macrophages dérivés du sang sont activés. Une fois activés, ceux-ci migrent au site infecté ou endommagé et libèrent des cytokines et médiateurs inflammatoires tels que IL1, TNF α , VEGF. Ces cytokines jouent un rôle essentiel dans l'inflammation du SNC puisqu'elles induisent des chimiokines tels que la sphingosine-1-phosphate (S1P), un sphingolipide fortement exprimé dans les glioblastomes et qui joue un rôle important dans la chimiotaxie et le trafic des cellules immunitaires. Nous avons étudié l'efficacité d'une molécule dérivée de notre diète possédant des propriétés chimiopréventives et anti-inflammatoires, l'épigallocatechine gallate (EGCG), sur la régulation transcriptionnelle des récepteurs de la S1P à divers stades de différenciation des cellules promyélomonocytaires HL-60. Nous avons d'abord différencié les cellules promyélomonocytaires HL-60 en «macrophages-like» en utilisant un promoteur tumorigène et activateur de la protéine kinase C – Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA). Nous avons démontré que le PMA induit l'adhésion cellulaire et augmente l'expression des transcrits S1P1, S1P2 et S1P5. Nous avons ensuite constaté que les cellules adhérentes semblaient être sensibles à la S1P en induisant la phosphorylation d'ERK, de JNK et de P38 MAPK. Cependant, l'inclusion de l'EGCG avant la différenciation par le PMA inhibe l'induction de ces trois voies MAPK par la S1P. D'autre part, un traitement par l'EGCG au cours de la différenciation, c'est-à-dire simultanément avec le PMA, affecte seulement la voie P38 MAPK. De plus, les cellules différenciées «macrophages-like» devenaient insensibles à l'EGCG. Enfin, nous démontrons que seul le récepteur S1P2, parmi les récepteurs fortement induits par le PMA, diminue lors du prétraitement par l'EGCG. Nos résultats suggèrent que l'EGCG antagonise la réponse à la S1P dans les cellules prédifférenciées via l'inhibition de la signalisation induite par le PMA. Par conséquent, une réponse réduite à la S1P pourrait abroger la migration transendothéliale des monocytes vers le SNC, et prévenir la neuroinflammation, les infections cérébrales secondaires ou certaines pathologies cérébrales conséquentes à l'infiltration de cellules immunitaires.

Mots clés : Neuroinflammation, S1P, EGCG, macrophages, chimiotactisme, chimioprévention

CHAPITRE I

INTRODUCTION

1.1. Le cancer

1.1.1. Généralités

Le terme cancer regroupe un ensemble de maladies caractérisées par une multiplication et une prolifération anarchique et indéfinie de cellules anormales, qui sont à l'origine de la formation d'un néoplasme, ou tumeur maligne. Ces cellules peuvent envahir au-delà des frontières de tissus sains et métastasier à des organes distants de la tumeur primaire (Stratton, Campbell et Futreal, 2009). Ces maladies peuvent prendre naissance dans n'importe quelle région du corps, évoluer et générer plusieurs types de cancers dont chacun sera unique en son genre (Almeida et Barry, 2010). Plusieurs facteurs sont responsables du développement des cancers comme le mode de vie, la consommation excessive d'alcool, le tabagisme, les habitudes alimentaires, les agents physiques (UV, rayons X) et les agents biologiques (virus de l'hépatite B), ainsi que les altérations du système immunitaire, l'inflammation et l'âge (Oliveira *et al.*, 2007 ; Weisburger, 1999). Le cancer peut être traité par plusieurs techniques telles que la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Les traitements futurs de cette terrible maladie reposeront sur une thérapie ciblée qui bloquerait la croissance de la tumeur en affectant des biomarqueurs oncogéniques spécifiques (Palazzo, Iacovelli et Cortesi, 2010).

1.1.2. Statistiques

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer est la principale cause de mortalité dans le monde. Le nombre de cas de cancer a doublé en 25 ans et on estime que le nombre de nouveaux cas et de décès liés à cette maladie augmentera de 60% d'ici 2031. Environ 186,400 nouveaux cas et 75,700 cas de mort associés au cancer ont été recensés au Canada en 2012. De ces nouveaux cas, 52% sont représentés par le cancer du poumon, du

sein, de la prostate et le cancer colorectal. Cette maladie peut survenir à tout âge, mais l'incidence augmente avec le vieillissement. Les deux sexes ne sont pas égaux vis-à-vis du risque de cancers. Au Canada, le cancer se développe chez les hommes un peu plus que chez les femmes. Chez les hommes, la probabilité d'être atteint d'un cancer au cours de la vie est de 46 %, tandis que chez les femmes, la probabilité est de 41 %. L'incidence du cancer varie d'un pays à l'autre, et même entre les régions géographiques d'une même nation. Ainsi, au Canada les taux d'incidence les plus élevés sont observés dans les provinces de l'Atlantique et au Québec, et les taux les plus faibles en Colombie-Britannique. Cette différence pourrait s'expliquer par des taux historiquement plus élevés de tabagisme au Québec et dans les provinces de l'Atlantique (Société canadienne du cancer, 2012).

1.1.3. La cancérogenèse

La cancérogenèse est l'ensemble des phénomènes qui conduisent à la transformation d'un tissu physiologique normal en un tissu cancéreux. Le cancer est un processus complexe qui peut être divisé en trois étapes distinctes à savoir : l'initiation, la promotion et la progression (Bocchetta et Carbone, 2004) (figure 1.1). L'initiation se déclenche en réponse à une ou plusieurs altérations génétiques induites par un carcinogène tel un virus, des produits chimiques et des agents physiques causant des mutations géniques irréversibles, prédisposant les cellules normales sensibles à l'évolution maligne (Oliveira et al., 2007 ; Shacter et Weitzman, 2002). L'étape de promotion est favorisée par d'autres facteurs, tels les hormones, les facteurs de croissance, l'inflammation chronique, et certaines substances chimiques accélèrent la prolifération cellulaire dans les tissus sensibles, qui renforcent les altérations géniques et provoquent des changements dans le contrôle de la croissance cellulaire (Mehta, 1995). La dernière longue étape de la cancérogenèse est la progression qui consiste à transformer les lésions pré-néoplasiques en lésions malignes ou cancers (Williams, 2001). Des nouveaux vaisseaux sanguins se forment pour assurer l'alimentation de la tumeur. Les cellules tumorales ainsi générées se propagent par les vaisseaux sanguins ou le système lymphatique pour atteindre d'autres tissus, un processus connu comme la métastase (Nakajima et al., 1989).

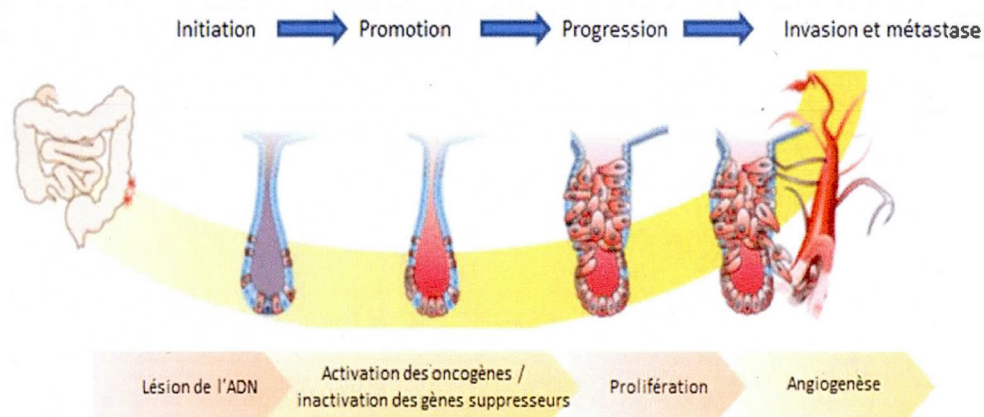


Figure 1.1. Les étapes de la cancérogenèse.

L'exposition à un carcinogène altère l'ADN des cellules saines induit la cancérogenèse. Des facteurs promoteurs tels les cytokines et les facteurs de croissance stimulent le développement des cellules initiées. Ces cellules entrent dans la phase de progression à cause des oncogènes activés et des gènes suppresseurs inactivés. Dans cette phase, les cellules prolifèrent de façon incontrôlée et forment une tumeur [Adapté de (Pan, Lai et Ho, 2010)].

La transformation d'une cellule saine en une cellule cancéreuse implique l'acquisition de caractéristiques biochimiques fondamentales telles que l'instabilité génétique, la résistance à l'apoptose, une croissance plus rapide, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une invasion des tissus et métastase, par des changements dans leurs caractéristiques métaboliques et morphologiques, ainsi que par l'induction de l'angiogenèse (Oliveira *et al.*, 2007) (figure 1.2).

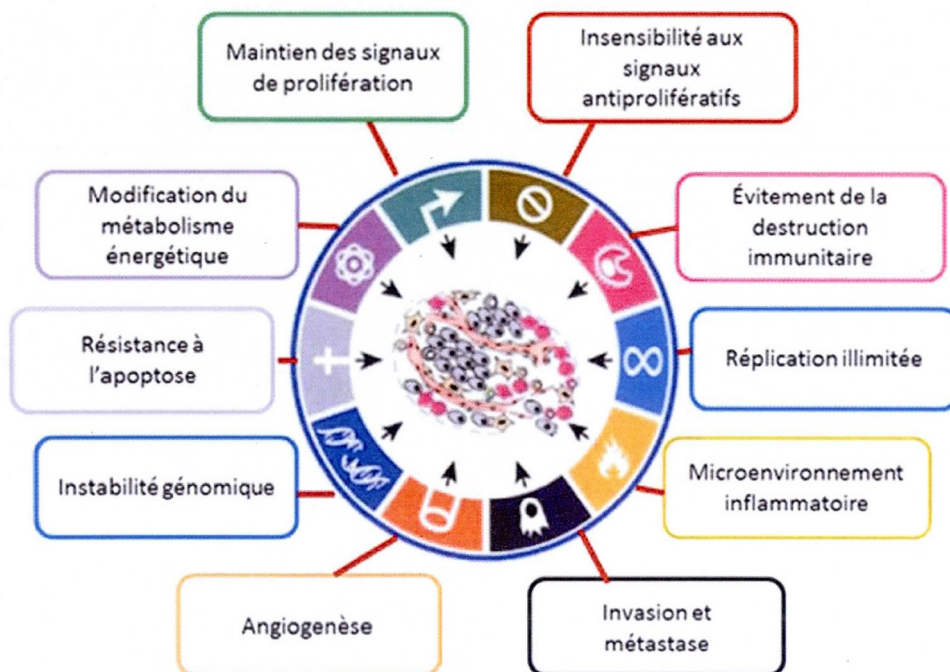


Figure 1.2. Les caractéristiques fondamentales du cancer.

Lors de la cancérogenèse, des changements phénotypiques permettent de caractériser la tumeur. D'après Hanahan et Weinberg, il existe 10 caractéristiques de la progression et du développement tumoral. [Adapté de (Hanahan et Weinberg, 2011)]

1.1.4. L'angiogenèse

1.1.4.1. Généralités

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sanguins se forment à partir de ceux préexistants. En physiologie normale, l'angiogenèse est essentielle au développement embryonnaire, à l'implantation, à la réparation ainsi qu'à la cicatrisation des tissus (Carmeliet, 2005). Il existe des sous types de l'angiogenèse : l'angiogenèse qui implique la stimulation des cellules endothéliales à proliférer dans la matrice environnante et qui conduit à la formation des nouveaux vaisseaux sanguins (Risau, 1998b, 1998a),

l'intussusception, une angiogenèse qui implique la division de la lumière d'un vaisseau sanguin déjà existant, entraînant la formation de deux vaisseaux (Burri et Djonov, 2002 ; Burri, Hlushchuk et Djonov, 2004). On appelle vasculogenèse le processus se caractérisant par la formation des vaisseaux sanguins à partir des cellules souches endothéliales ou angioblastes (Patan, 2004).

1.1.4.2. L'angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est la génération d'un réseau de vaisseaux sanguins au sein d'une tumeur. Elle est indispensable à la croissance des tumeurs et au processus métastatique (Shubik, 1982). Lorsque le foyer tumoral atteint un volume d'environ 1 mm^3 , la tumeur devient hypoxique et l'apport en oxygène et en nutriments n'est plus suffisant pour maintenir les fonctions optimales des cellules cancéreuses (Folkman, 1996). D'où le déclenchement du processus de l'angiogenèse qui est régulé par une balance entre les activateurs ou facteurs pro-angiogéniques et des inhibiteurs ou facteurs anti-angiogéniques (Goh, Sze et Roufogalis, 2007). En fait, l'hypoxie est un phénomène cellulaire caractérisé par une déficience en oxygène, et qui stimule les cellules cancéreuses à sécréter des facteurs pro-angiogéniques, tels le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et le facteur de croissance fibroblastique basique (bFGF). Ces facteurs se lient à des récepteurs à activités tyrosines kinases retrouvés à la surface des cellules endothéliales. Ceci déclenche une cascade de signalisation activant la croissance des cellules endothéliales (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). Les cellules endothéliales activées produisent également des métalloprotéinases matricielles (MMP) permettant la dégradation de la matrice extracellulaire (MEC) et la migration des cellules endothéliales. La division et la migration de ces cellules conduisent à la formation de nouveaux capillaires (Annabi *et al.*, 2003 ; Cierniewski *et al.*, 2007 ; Mignatti et Rifkin, 1996) (figure 1.3). Ces vaisseaux tumoraux se distinguent des vaisseaux normaux par leur structure dilatée chaotique et par leur perméabilité accrue (Jain, 2002).

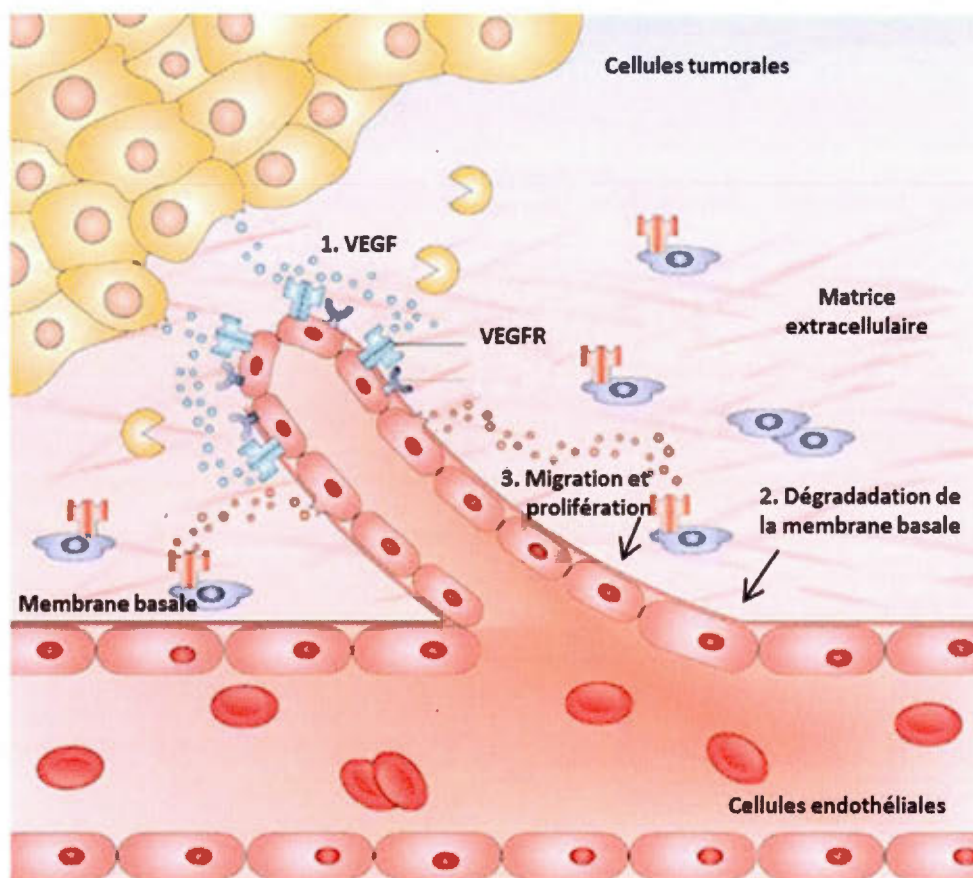


Figure 1.3. Le processus d'angiogenèse tumorale.

Les cellules tumorales sécrètent des facteurs pro-angiogéniques qui se lient à leurs récepteurs à la surface des cellules endothéliales. Cette liaison stimule la production des métalloprotéinases matricielles (MMP) par les cellules endothéliales permettant la dégradation de la membrane basale entourant le vaisseau. Les cellules endothéliales migrent vers la source du stimulus et prolifèrent rapidement pour former un nouveau vaisseau. [Adapté de (Cristofanilli, Charnsangavej et Hortobagyi, 2002)]

La néovascularisation tumorale est essentielle au développement des cancers solides. L'inhibition de l'angiogenèse tumorale et de la prolifération des cellules tumorales permettraient d'optimiser les approches thérapeutiques actuelles (Hillen et Griffioen, 2007). En effet, il existe plusieurs types d'inhibiteurs de l'angiogenèse. Certains sont naturellement

présents dans le corps humain, tels les fragments spécifiques des protéines structurales comme le collagène ou le plasminogène (Folkman, 2004). D'autres sont des produits naturels dérivés de notre diète et présents dans le thé vert, les champignons, le soya, et plusieurs autres produits végétaux (Madhusudan et Harris, 2002). La plupart des produits naturels anti-angiogéniques bloquent la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à plusieurs niveaux. L'épigallocatechine gallate (EGCG) extrait du thé vert, peut inhiber l'angiogenèse en inhibant une série d'activité qui favorise l'angiogenèse telle que la production du facteur de croissance transformant bêta (TGF β), l'amplification de la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui joue également un rôle dans la transition des lésions pré-néoplasiques vers un phénotype invasif, le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), et l'amplification de signalisation médiée par le facteur nucléaire kappa B (NF- κ B) (Sagar, Yance et Wong, 2006). Des études précliniques ont démontré que la combinaison d'agents anti-angiogéniques avec des agents cytotoxiques ou avec de la radiothérapie provoquent des effets anti-tumoraux additifs et synergiques. Ainsi, la co-administration d'agents anti-angiogéniques et certains agents chimiothérapeutiques naturels permettrait possiblement une meilleure action anti-tumorale (Ferrara et Davis-Smyth, 1997).

1.1.5. Facteurs de croissance

Les facteurs de croissance sont des protéines qui se fixent à des récepteurs transmembranaires spécifiques. Ces récepteurs sont formés de 3 domaines : un domaine extracellulaire qui lie le facteur de croissance, un domaine transmembranaire qui fixe le récepteur dans la membrane et un domaine intracellulaire qui permet la transduction du signal et qui porte souvent une activité tyrosine kinase (Schlessinger, 2000). L'interaction entre le facteur de croissance et son récepteur entraîne souvent une dimérisation de ce dernier, qui permet son autophosphorylation au niveau des résidus tyrosines (Heldin, 1995). Ceci permet l'activation des seconds messagers qui, à leur tour, déclenchent des cascades de phosphorylation permettant la transmission du signal, qui peut entraîner différentes réponses cellulaires (Thissen, 2007) (figure 1.4). Les facteurs de croissance régulent de multiples effets physiologiques, spécialement la croissance, le métabolisme et la différenciation (Raff, 1996). Ils interagissent de manière similaire aux hormones et s'en distinguent par le caractère

ubiquitaire de leur production et de leur mode d'action, qui sont le plus souvent locaux. Les facteurs de croissance exercent leurs effets biologiques soit par voie autocrine, soit par voie paracrine, à l'exception de facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) qui agit en plus par voie endocrine.

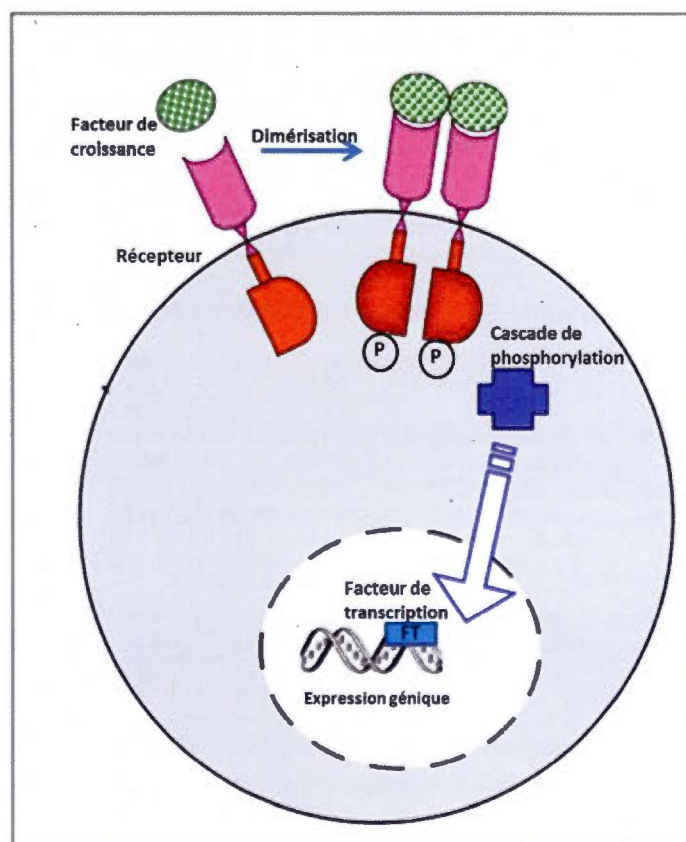


Figure 1.4. Mode d'action des facteurs de croissance.

La fixation du facteur de croissance à son récepteur entraîne une dimérisation de ce dernier qui, par son activité tyrosine kinase, permet son autophosphorylation. Ensuite, une cascade de phosphorylation se déclenche permettant la transmission du signal au noyau et l'activation des facteurs de transcription qui provoquent différentes réponses cellulaires [Tiré de (Hubert, 2006)].

Les facteurs de croissance sont classifiés en sept grandes familles selon leur action physiologique et cellulaire: le facteur de croissance de l'épithélium (EGF), le facteur de croissance fibroblastique (FGF), le facteur de croissance neuronaux (NGF), le facteur de

croissance plaquettaire (PDGF), le facteur de croissance transformant (TGF), le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), et le facteur de croissance analogue à l'insuline (IGF) qui constitue la famille de facteurs de croissance la plus étudiée (Thissen, 2007).

Les facteurs de croissance stimulent et assurent le fonctionnement normal des cellules. Ils sont aussi impliqués dans le développement ou l'inhibition de processus cancéreux. De diverses anomalies concernant le système de facteurs de croissance ont été observées dans différentes tumeurs, tels que la surexpression des facteurs de croissance, ou la surexpression ou la modification de ses récepteurs (Anses, 2012). Ces dérégulations constituent la cible thérapeutique de traitement anticancéreux utilisant des antagonistes des récepteurs ou des inhibiteurs qui bloquent les facteurs de croissance impliqués dans le développement des cellules cancéreuses. Les facteurs de croissance sont sécrétés par la tumeur dans le milieu environnant. Lorsqu'ils viennent en contact avec des cellules endothéliales, ils s'associent à des récepteurs à activité tyrosine kinase retrouvés à la surface des cellules activant ainsi divers cascades de signalisation (Ferrara et Davis-Smyth, 1997). En outre, les cellules endothéliales sont capables de produire de la sphingosine-1-phosphate (S1P) suite à la stimulation par ces divers stimuli. Il a été démontré que ce composé stimule la migration des cellules endothéliales ainsi que la cicatrisation cellulaire (Hla *et al.*, 2000).

1.2. La sphingosine-1-phosphate

1.2.1. Généralités

La sphingosine-1-phosphate (S1P) est un sphingolipide abondamment emmagasiné dans les plaquettes, qui possèdent une activité sphingosine kinase (SPHK) très élevée (Yatomi *et al.*, 2004). La S1P est libérée de manière extracellulaire au cours de l'activation plaquettaire par des stimulants prothrombotiques tels que la thrombine, le collagène, ou l'ADP qui sont capables d'activer la protéine kinase C (Yatomi *et al.*, 2000 ; Yatomi *et al.*, 2001). La S1P est sécrétée par de nombreux autres types cellulaires, notamment les monocytes, les cellules endothéliales, les érythrocytes et les glioblastomes (Van Brocklyn *et*

al., 2005). La concentration de S1P peut varier dans le plasma de 0.1 à 0.6 μM et dans le sérum de 0.4 à 1.1 μM (Berdyshev *et al.*, 2005 ; Oskeritzian, Milstien et Spiegel, 2007). La S1P peut agir comme un second messenger intracellulaire en régulant le taux de calcium, la croissance et la survie cellulaire (Spiegel et Milstien, 2002). La S1P peut aussi agir de façon autocrine et/ou paracrine en se liant à des récepteurs spécifiques et ainsi déclencher différentes voies de signalisation (MAPK, PI3K) qui stimulent la migration et la différenciation cellulaire (Rosen et Goetzl, 2005), ainsi que l'angiogenèse (Spiegel et Milstien, 2003). Une étude a montré que la S1P agit en synergie avec d'autres facteurs angiogéniques comme le FGF-2 et le VEGF pour induire l'angiogenèse et la maturation vasculaire (Lee *et al.*, 1999b). De plus, de nombreux effets de la S1P sur les cellules endothéliales ont été décrits, tels la diminution de la perméabilité endothéliale, de l'organisation du cytosquelette cortical et la stimulation de l'expression des molécules d'adhésion cellulaires (McVerry et Garcia, 2004 ; Panetti, 2002). Dans la plupart des types cellulaires, la S1P favorise la prolifération et la chimiotaxie cellulaire (Sabbadini, 2006).

1.2.2. Métabolisme de la sphingosine-1-phosphate

Le niveau de S1P est étroitement régulé par une balance entre sa synthèse et sa dégradation (Brizuela *et al.*, 2010). La S1P est générée par la sphingomyélinase à partir du métabolisme de la sphingomyéline en céramide. Sa synthèse est activée suite à une stimulation des cellules par le stress cellulaire, notamment les cytokines, les agents cytotoxiques, le stress environnemental tel que le choc thermique et les rayonnements ultraviolets (Sawai et Hannun, 1999). De plus, certains facteurs de croissance, dont le PDGF (Olivera et Spiegel, 1993) et l'acide arachidonique, peuvent aussi activer les sphingomyélinases (Marchesini et Hannun, 2004). Les céramidases, quant à elles, catalysent la déacétylation des céramides pour générer un acide gras libre et de la sphingosine. L'activité de la SPHK, dont il existe deux isoformes (SPHK1, SPHK2), catalyse la synthèse de la S1P en phosphorylant la sphingosine. La S1P peut être dégradée par une déphosphorylation réversible dans le réticulum endoplasmique catalysée par une S1P phosphatase ou par une lyase (Spiegel et Milstien, 2003) (figure 1.5).

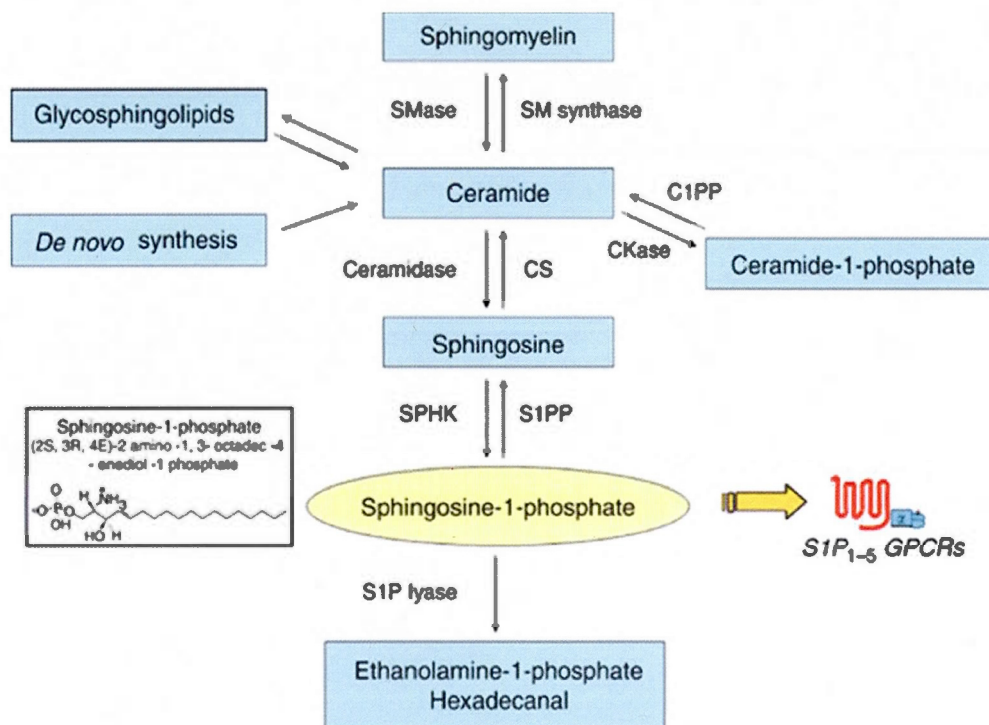


Figure 1.5. Le métabolisme des sphingolipides.

Les céramides peuvent être synthétisés *de novo* ou par l'action de sphingomyélinases. Ensuite, les céramidases catalysent la déacétylation des céramides pour produire un acide gras libre et de la sphingosine. La sphingosine peut ensuite être phosphorylée par la sphingosine kinase pour donner de la sphingosine-1-phosphate (S1P). La S1P pourra à son tour être clivée par la S1P lyase ou déphosphorylée par la S1P phosphatase.

SMase : sphingomyélinase; **SM synthase** : sphingomyéline synthase; **C1PP** : céramide-1-phosphate; **CKase** : céramide kinase; **CS** : céramide synthase; **SPHK** : sphingosine kinase; **S1PP** : sphingosine-1-phosphate phosphatase; **S1P lyase** : sphingosine-1-phosphate lyase.
[Tiré de (Sabbadini, 2006)]

1.2.3. Les récepteurs de la sphingosine-1-phosphate

La S1P constitue un ligand de haute affinité des récepteurs plasmatiques spécifiques. Jusqu'à présent, cinq membres de la famille des récepteurs de la S1P ont été identifiés : S1P1/Edg1, S1P2/Edg5, S1P3/Edg3, S1P4/Edg6, et S1P5/Edg8 (Kluk et Hla, 2002). Ces récepteurs avaient été initialement nommés EDG «endothelial differentiation gene-1», mais sont désormais connus sous le nom des récepteurs à la sphingosine-1-phosphate S1P1 à S1P5 (Chun *et al.*, 2002). Ces récepteurs sont couplés à différentes protéines G (GPCRs), et leur distribution tissulaire est variable. S1P1, S1P2, et S1P3 sont largement exprimés dans plusieurs tissus, tandis que l'expression de S1P4 est restreinte aux tissus lymphoïdes et hématopoïétiques et S1P5 au système nerveux central (Sanchez et Hla, 2004).

S1P1 est exprimé de manière ubiquitaire dans plusieurs types cellulaires (cardiovasculaires, immunitaires et celles du SNC) et représente le récepteur le plus étudié (Taha, Argraves et Obeid, 2004). Ce récepteur est couplé à la protéine G de type $G_{i\alpha}$ (Lee, Evans et Hla, 1996). La liaison de la S1P à S1P1 induit la phosphorylation du récepteur, l'induction de la voie MAPK (ERK), et l'activation de la voie de survie PI3K/AKT (Taha, Argraves et Obeid, 2004). S'ensuivent l'activation de la prolifération (Young et Van Brocklyn, 2007) et de la migration cellulaire via PI3K et Rac (Lee *et al.*, 1999a ; Okamoto *et al.*, 2000). Ces effets sont médiés par la sous-unité $G_{i\beta\gamma}$. De plus, cette liaison inhibe l'adénylate cyclase (AC) via la sous-unité $G_{i\alpha}$ (Okamoto *et al.*, 1998) (figure 1.6 A).

S1P2 couplé aux protéines G de type G_i , G_q et G_{13} . Ce récepteur est impliqué dans l'activation de la voie MAPK (ERK) via la sous-unité $G_{i\beta\gamma}$ ainsi que les deux voies JNK et P38 MAPK (Taha, Argraves et Obeid, 2004), de la phospholipase C (PLC) via la sous-unité G_q , menant à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Ancellin et Hla, 1999), à l'activation de la cascade de signalisation PI3K/AKT et de la voie Rho (Okamoto *et al.*, 2000). Contrairement au S1P1, le récepteur S1P2 active l'AC par un mécanisme inconnu. Il a été démontré que S1P2 régule négativement l'activité de Rac inhibant ainsi la migration cellulaire en réponse à des agents chimioattractants comme le PDGF (Okamoto *et al.*, 2000) (figure 1.6 B).

S1P3 est exprimé principalement au niveau des tissus cardiaques, placentaire, rénal, hépatique, pulmonaire, pancréatique, utérin, du tissu adipeux, du thymus, de la rate, et des testicules. Ses effets sont très similaires à ceux du S1P1 (Ishii *et al.*, 2001). Comme S1P2, le récepteur S1P3 est couplé aux protéines G de type Gi, Gq et G13 (Lee *et al.*, 1999a). En se liant au S1P3, la S1P induit la voie des MAPK (ERK), la survie et la prolifération cellulaire (An, Zheng et Bleu, 2000). De plus, ce récepteur induit l'activation de Rac et Ras (Taha *et al.* 2004). Comme le S1P1, le S1P3 inhibe l'AC (Okamoto *et al.*, 1999) (figure 1.6 C).

La distribution tissulaire des récepteurs S1P4 et S1P5 est beaucoup plus restreinte que les trois autres types de récepteur à la S1P cités ci-dessus (Kluk et Hla, 2002). Le S1P4 est lié aux protéines G de type Gi et G13, et est exprimé principalement dans les tissus hématopoïétiques (rate, thymus, ganglions lymphatiques et poumons). L'interaction S1P/S1P4 stimule l'activité de Cdc 42, PLC et ERK, ainsi que l'activation de la voie de Rho, et l'AC (Taha, Argraves et Obeid, 2004). Le récepteur S1P5 est exprimé principalement dans les cellules du SNC (Toman et Spiegel, 2002). S1P5 est couplée aux protéines Gi et G12. L'interaction S1P/S1P5 mène à l'induction de la voie MAPK (JNK) et à l'inhibition d'ERK et de l'AC (Kluk et Hla, 2002), s'ensuivent l'inhibition de la migration et l'induction de la survie des cellules nerveuses (oligodendrocytes) (Novgorodov *et al.*, 2007) (figure 1.6 D et E).

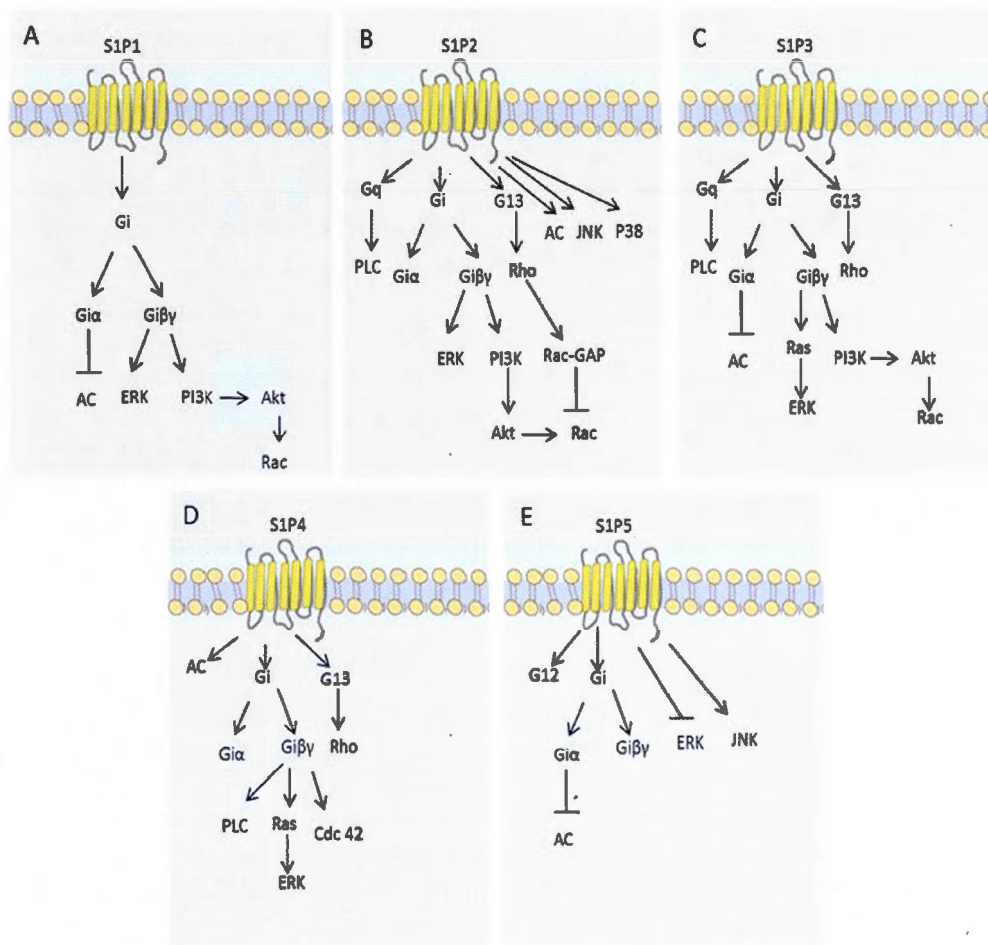


Figure 1.6. Les voies de signalisation associées aux récepteurs de la S1P.

A) S1P1 est couplé seulement à G_i et induit l'activation d'ERK, de PI3K/Akt et inhibe l'adénylate cyclase (AC). B, C) S1P2 et S1P3 sont couplés à G_i , G_q et G_{13} . Ils induisent l'activation de la phospholipase C (PLC), d'ERK, de PI3K/Akt, et de Rho. S1P2 induit aussi l'activation de JNK, de P38 MAPK et de l'AC ainsi que l'inhibition de Rac. S1P3 induit l'activation de Rac et l'inhibition de l'AC. D) S1P4 est couplé à G_i et G_{13} . Il active la PLC, ERK et Rho, ainsi que l'AC. E) S1P5 est couplé à G_i et G_{12} . Il régule l'induction de JNK, et l'inhibition d'ERK et de l'AC [Adapté de La Lettre du Pharmacologue ; juin 2012 ; mise au point ; O. Cuvillier].

1.2.4. Sphingosine-1-phosphate et cancer

Plusieurs processus régulés par la S1P jouent un rôle physiologique important dans les cellules, mais peuvent aussi induire des pathologies sévères comme le cancer (Törnquist, 2013). De nombreuses données mettent en évidence le rôle de la S1P dans la progression tumorale, notamment dans le développement des tumeurs gliales (Van Brocklyn *et al.*, 2005). La S1P stimule la prolifération et le potentiel métastatique de cellules de glioblastomes, ainsi ses récepteurs se retrouvent en abondance dans la plupart de ces tumeurs (Van Brocklyn *et al.*, 2002). De plus, des concentrations importantes de S1P ont été mesurées dans le cerveau (Edsall et Spiegel, 1999). La S1P possède un pouvoir angiogénique, et peut jouer un rôle important dans le développement tumoral (Panetti, 2002). La SPHK de type 1 est une des isoformes de la SPHK, responsable de la synthèse et de la libération de la S1P dans le compartiment extracellulaire. Des études ont montré que cette enzyme est surexprimée dans plusieurs types de cancers, tels que ceux du sein, du côlon, du poumon, de l'ovaire, de l'estomac, de l'utérus, du rein et du rectum (Kawamori *et al.*, 2006 ; Sabbadini, 2006). La propriété pro-oncogénique de SPHK est également observée lors de la transfection des fibroblastes NIH-3T3 avec un plasmide encodant la SPHK1 amène à une prolifération cellulaire accrue suite à la surexpression de la S1P (Sabbadini, 2006). En outre, dans un modèle de xénogreffe orthotopique de souris nues, les cellules surexprimant la SPHK recombinante peuvent générer des tumeurs qui se caractérisent par une résistance accrue à la chimiothérapie (Pchejetski *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que des cellules tumorales entrent en apoptose lorsqu'elles sont traitées avec des inhibiteurs de la SPHK, et cette efficacité est expliquée par la capacité de ces inhibiteurs à réduire les niveaux de S1P (Bektas *et al.*, 2005).

1.2.5. Voies de signalisation MAPK induites par la sphingosine-1-phosphate

Les voies de signalisation MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*) sont impliquées dans plusieurs processus biologiques, tels que la prolifération, la différenciation, l'apoptose et la migration cellulaire. Ces voies peuvent être activées par divers stimuli y compris les hormones, les facteurs de croissance, et le stress environnemental, tels que le

choc osmotique, les rayonnements ionisants (Kyriakis et Avruch, 2001). Il existe cinq groupes de MAPK : Erk1/2 (extracellular regulated protein kinase), JNK1/2/3 (c-Jun amino-terminal kinase), P38 MAPK, Erk 5 et les MAPK orphelines qui sont constituées d'ERK3, ERK7, NLK et MOC (Chen et al., 2001). Parmi ces kinases, ERK1/2, JNK1/2, et p38 MAPK sont les plus étudiées chez les vertébrés.

1.2.5.1. La voie ERK

La voie de signalisation ERK est représentée par huit isoformes (ERK 1-8). Les protéines kinases ERK1/2 sont les isoformes les plus exprimées et sont aussi nommées p42/44. Leurs séquences sont à 90% identiques et sont exprimées de façon ubiquitaire (Bogoyevitch et Arthur, 2008). ERK1/2 sont des sérines/thréonine kinases (Meister *et al.*, 2013). La voie de ERK1/2 peut être activée par les facteurs de croissance, les cytokines, le sérum, les esters de phorbol, les stress osmotiques, les ligands des récepteurs couplés aux protéines G, et la désorganisation des microtubules (Chen *et al.*, 2001).

La voie ERK est initiée par les récepteurs de la surface cellulaire, tels que les tyrosines kinases et les GPCR. Ces récepteurs transmettent leur signal d'activation via la petite GTPase Ras. La transmission du signal des récepteurs vers Ras se fait via SOS (Son of Sevenless), un facteur d'échange de nucléotide guanine, et GRB2 (Growth factor receptor-bound protein 2). SOS induit l'échange du GDP pour du GTP chez Ras, ce qui lui permet d'interagir avec certains effecteurs en aval tels les isoformes de Raf. Raf activé phosphoryle les deux kinases MEK1 et MEK2 qui, à leur tour, vont activer ERK1/2 sur les résidus thréonine 183 et tyrosine 185 d'un motif très conservé Thr-Glu-Tyr (TEY) (Roux et Blenis, 2004). L'activation de la voie des ERK1/2 contribue à la régulation post-transcriptionnelle de plusieurs gènes (Chang et Karin, 2001) (figure 1.7).

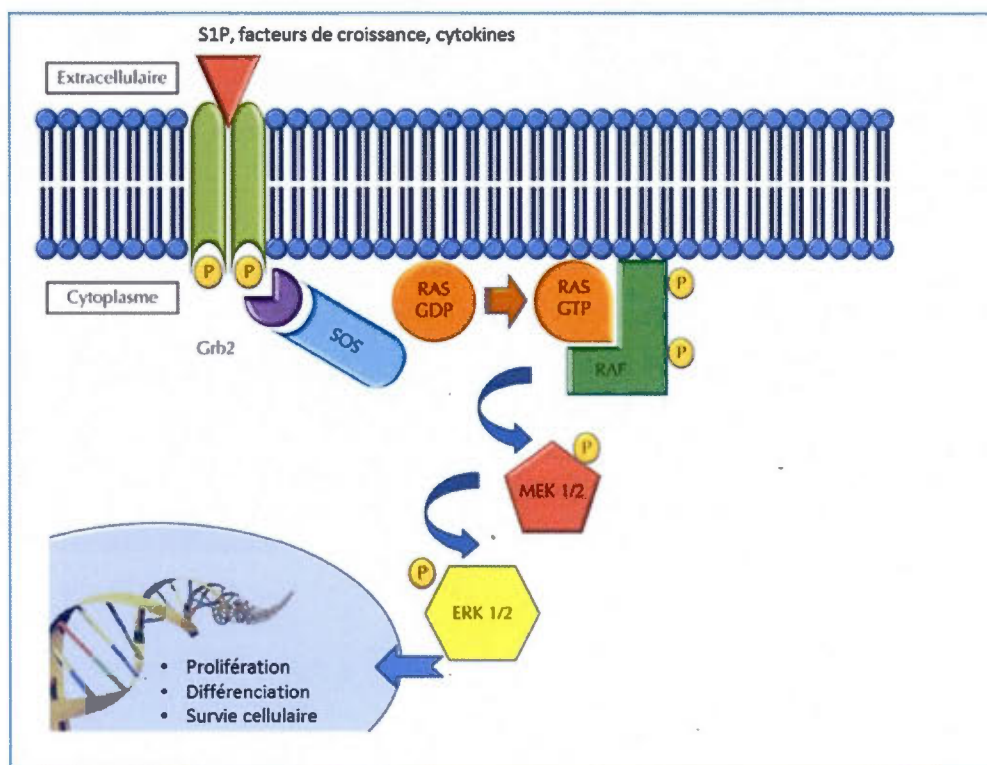


Figure 1.7. Schéma simplifié de la voie ERK/MAPK.

L'activation des récepteurs par des facteurs de croissance ou des cytokines entraîne l'activation de Ras via Sos et GRB2. Ceci permet à RAS d'interagir avec RAF qui ensuite phosphoryle MEK1/2 qui, à leur tour, vont activer ERK1/2. [Adapté de (Capucine Baldini, 2012)]

1.2.5.2. La voie JNK

La voie de signalisation des MAP kinases JNK, est aussi nommée SAPK (*Stress Activated Protein Kinase*) puisqu'elle est activée par des stimuli de stress comme le choc thermique ou osmotique, par les cytokines inflammatoires comme le TNF α , et les rayons ionisants (Pombo *et al.*, 1994). Il existe trois isoformes de JNK : JNK1, JNK2 et JNK3. Les deux kinases JNK1 et JNK2 sont exprimées de façon ubiquitaires, alors que JNK3 est spécifique du cerveau, du cœur et des testicules. Les protéines JNK lient la portion N-terminale de la protéine c-Jun et la phosphorylent sur les résidus sérines 63 et 73 (Davis,

2000). JNK est activée par les deux MAP kinase kinases MEK4 et MEK7 qui sont elles-mêmes phosphorylées et activées par plusieurs MAPKKs kinase, comme MEKK1/2/3/4 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase), MLK2/3 (pour Mixed Lineage Kinase), ASK (Apoptosis Signal-regulating kinase) (Qi et Elion, 2005). Les protéines MEK4 et MEK7 vont, à leur tour, activer JNK1/2/3 via la double phosphorylation sur des résidus tyrosine et thréonine du motif conservé Thr-Pro-Tyr (TPY) dans leur boucle d'activation. Une fois activées, les kinases JNK peuvent être transloquées du cytoplasme vers le noyau, pour activer ou inhiber certains facteurs transcriptionnels par phosphorylation (Roux et Blenis, 2004) (Figure 1.8).

1.2.5.3. La voie P38

Il a été identifié que la voie de signalisation P38 est activée suite à une stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) bactérien (Han *et al.*, 1994), ainsi qu'en réponse à d'autres stimuli comme les facteurs de croissance, le stress environnemental, et les cytokines (Lee *et al.*, 1994). Il existe quatre isoformes de la famille P38 MAPK qui partagent environ 60 % d'homologie : p38 α , p38 β , p38 δ , p38 γ . La MAPK p38 α a été identifiée comme étant la «*cytokine suppressive anti-inflammatory drug binding proteins*» (CSBPs) qui peut se lier à des composés de pyridinyl imidazole, connus pour inhiber la synthèse des cytokines pro-inflammatoires dans les monocytes stimulés au LPS (Chen *et al.*, 2001). Les kinases p38 α et p38 β sont exprimées de façon ubiquitaire et sont inhibées par les dérivés du pyridinyl imidazole, tandis que p38 γ est exprimée majoritairement dans les muscles squelettiques et son expression est augmentée durant la différenciation musculaire. La p38 δ est surtout exprimée dans les testicules, le pancréas, les poumons et l'intestin. Ces deux kinases, contrairement aux p38 α et p38 β , sont résistantes aux dérivés du pyridinyl imidazole. (Chen *et al.*, 2001 ; Ono et Han, 2000). Toutes ces kinases possèdent la séquence Thr-Glu-Tyr (TGY) dans leur boucle d'activation (Hanks et Hunter, 1995) et sont activées par la phosphorylation de cette séquence par les MAPK Kinases MKK3/4/6 (Jiang *et al.*, 1996), ce qui mène à l'activation de certains facteurs de transcription tels que l'ATF-1 (Tan *et al.*, 1996) et le NF- κ B (Kumar, Boehm et Lee, 2003) (figure 1.8).

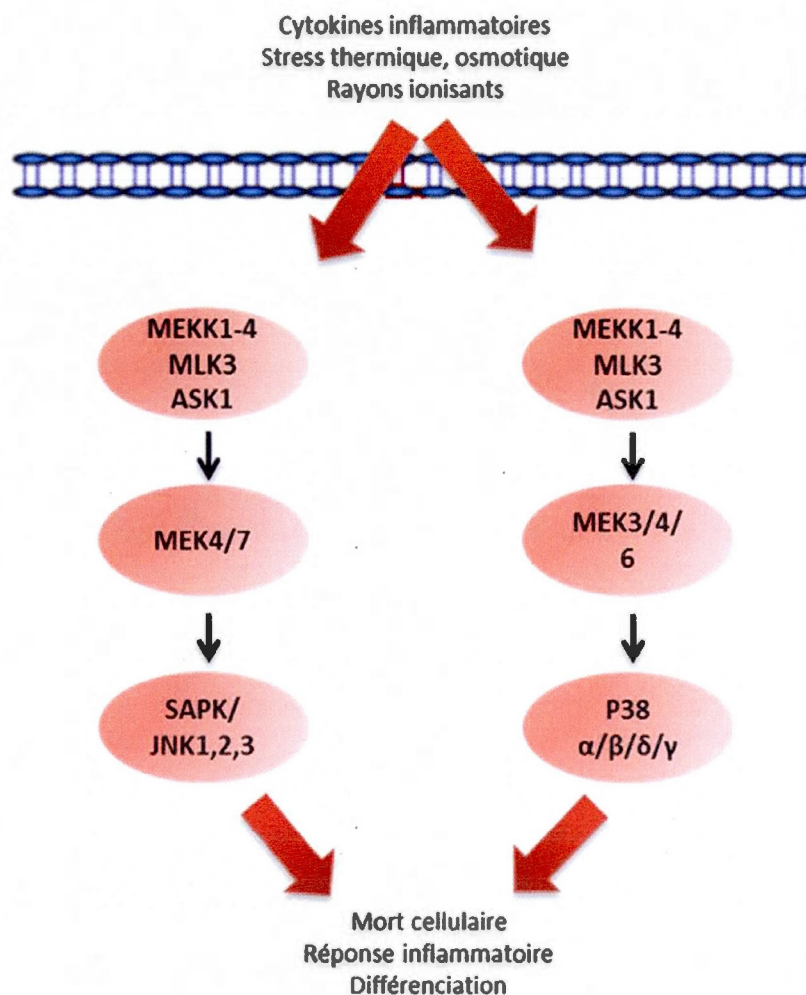


Figure 1.8. Schéma simplifié des voies JNK et P38/MAPK.

Des stimuli tels que les cytokines, le stress thermique et les rayons ionisants vont activer MEKK1/2/3/4, MLK3 et ASK1. Ces MAPKK activent à leur tour MEK4 et MEK7, qui vont activer JNK, soit MEK3, MEK4 et MEK6 qui vont activer P38 [Adapté de <http://www.cellsignal.com>].

1.3. Le système nerveux central

Le système nerveux central (SNC) est composé de l'encéphale (cerveau, tronc cérébral et cervelet) et de la moelle épinière. Il joue un rôle fondamental dans la conduction, la transmission et le traitement des informations. Le SNC est composé de plusieurs types cellulaires tels que les cellules nerveuses ou neurones qui constituent l'unité fonctionnelle du système nerveux (SN) et les cellules gliales (astrocytes, cellules épendymaires, oligodendrocytes et cellules microgliales). Le SNC a été considéré comme un site immunitaire privilégié. Peter Medawar a été le premier à suggérer ce privilège immunitaire (Medawar, 1948). Il a démontré que le SNC n'était pas affecté par les réponses immunitaires en raison de son isolement de la circulation périphérique par la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, dans la dernière décennie suite aux recherches sur les interactions du système immunitaire avec le cerveau, cette vue a changé. Il est maintenant reconnu que le SNC n'est ni isolé ni passif dans ses interactions avec le système immunitaire (Carson *et al.*, 2006).

1.3.1. La barrière hémato-encéphalique

En 1885, Paul Ehrlich était le premier à démontrer expérimentalement que le cerveau est un site isolé (Ehrlich, 1885). Il a observé qu'après l'administration intraveineuse des colorants vitaux, tous les organes ont été colorés à l'exception des tissus cérébraux. Plus tard, Edwin Goldman démontra que l'injection d'un colorant dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) ne pouvait colorer que les tissus du SNC (1913). Ceci suggérait donc la présence d'une «barrière» entre le CNS et la circulation sanguine, nommée la barrière hémato-encéphalique (BHE). La BHE est une barrière fonctionnelle complexe qui sépare la circulation sanguine et le LCR. Elle est composée des cellules endothéliales unies les unes aux autres par des jonctions intracellulaires, des astrocytes et des péricytes (Hart et den Dunnen, 2013) (figure 1.9). La BHE régule étroitement les échanges sang-cerveau grâce aux jonctions serrées qui connectent les cellules endothéliales (de Vries *et al.*, 2012). La BHE est une barrière de transport qui permet l'entrée des nutriments nécessaires au cerveau, mais en revanche, elle joue un rôle dans la protection du SNC en limitant l'entrée des multiples

substances et agents toxiques (toxines, bactéries et antigènes) et de cellules immunitaires (Demeule *et al.*, 2002). Enfin, la BHE est un obstacle à l'acheminement de médicaments au SNC. Plusieurs pathologies, notamment la neuroinflammation, sont associées à l'altération du fonctionnement de la BHE (de Vries *et al.*, 2012).

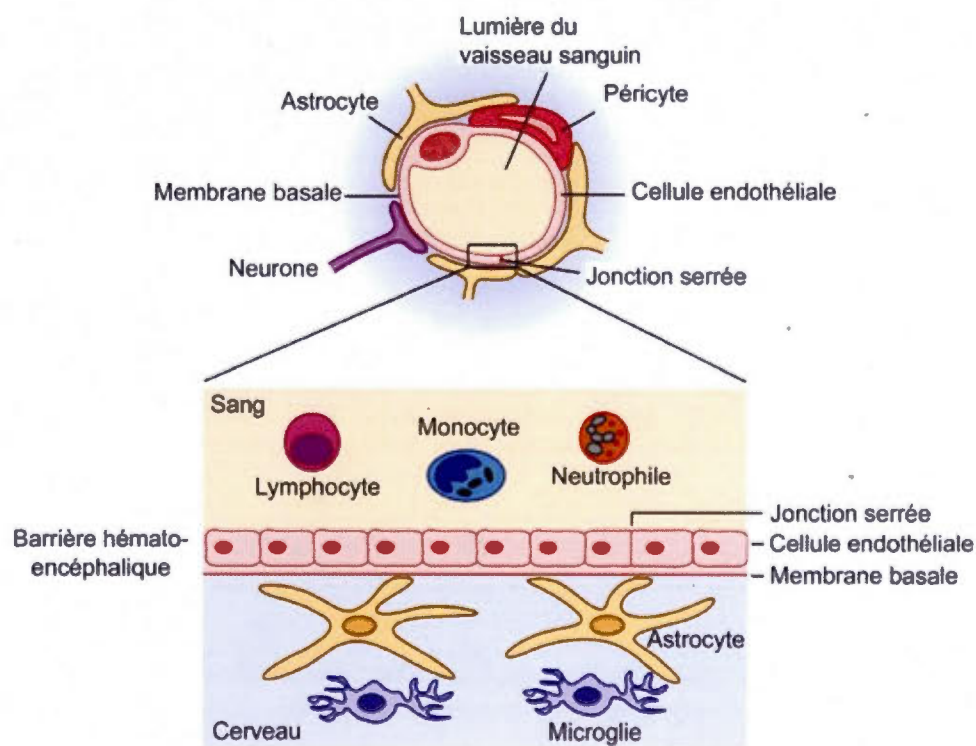


Figure 1.9. Structure de la barrière hémato-encéphalique.

La barrière hématoencéphalique est composée de cellules endothéliales cérébrales reliées par des jonctions serrées. Elle est entourée par des astrocytes et des péricytes. Les cellules endothéliales sont supportées par une membrane basale [Adapté de (Blasi *et al.*, 2007)].

1.3.2. Neuroinflammation

L'inflammation est un mécanisme protecteur qui vise à détruire les cellules endommagées, à éliminer les tissus morts et à promouvoir les cicatrisations des plaies (Hurley et Tizabi, 2013). Elle sert aussi à isoler et contenir l'action des agents infectieux. L'inflammation contribue à la défense tissulaire par la production de substances cytotoxiques, de chimiokines pour le recrutement des cellules immunitaires spécifiques ainsi que de cytokines (Carson *et al.*, 2006). Ce processus peut être activé au sein de n'importe quel compartiment vascularisé du corps incluant le SNC. La neuroinflammation est définie comme un large éventail de changements moléculaires et cellulaires dans le cerveau, conséquents à différents stimuli inflammatoires, tels les infections, les traumatismes, et les anomalies métaboliques (Cai, 2013). La réponse à ces agressions est principalement médiée par l'intermédiaire des différents types cellulaires à savoir: les cellules gliales du SNC, les lymphocytes, les monocytes et les macrophages du système hématopoïétique (Hurley et Tizabi, 2013). Des études ont montré que la neuro-inflammation non régulée pourrait conduire à des maladies neurodégénératives, dont la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose en plaques et la sclérose latérale amyotrophique (Nguyen *et al.*, 2004).

1.3.3. La migration des cellules immunitaires au SNC

Lors d'un processus inflammatoire, les leucocytes sont recrutés du sang vers le site de lésion par des cytokines pro-inflammatoires (Springer, 1994). Ces cytokines présentes dans le SNC induisent l'expression de molécules d'adhérence, de chimiokines, et de cytokines, ainsi que l'activation de l'endothélium afin de faciliter le recrutement des cellules immunitaires. La voie d'entrée des leucocytes dans le SNC la plus étudiée est celle du passage au travers de la BHE (Man, Ubogu et Ransohoff, 2007). La migration des leucocytes s'effectue en plusieurs étapes (figure 1.10). Ce processus est déclenché par un contact des leucocytes avec l'endothélium vasculaire qui implique des sélectines endothéliales-molécules d'adhérence- et leurs ligands qui ralentissent les leucocytes dans le sang et leur permettent de «rouler» le long de la paroi vasculaire sous les forces du flux sanguin. Trois

types de sélectines sont définis : les sélectines L, E et P. La sélectine L se trouve à la surface des leucocytes et se lie à des ligands osidiques de la surface des cellules endothéliales vasculaires. Les sélectines P et E sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et se lient aux ligands osidiques des leucocytes (Kubes et Ward, 2000). Ce contact entre les cellules endothéliales et les cellules immunitaires stimule les cellules endothéliales à sécréter des chimiokines qui vont se lier aux leucocytes roulant par leurs récepteurs. La liaison des chimiokines à leur récepteur va permettre l'expression des molécules d'adhérence de la famille des intégrines à la surface des leucocytes, permettant l'adhésion ferme à l'endothélium. MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1; CCL2*), MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein 1 α*), IP-10 (*Interferon gamma-induced protein 10*) sont des chimiokines importantes pour le recrutement des lymphocytes, et des monocytes (Samson, Aubry et Parmentier, 1999). Des études ont montré qu'à cette étape la S1P est un facteur chimiotactique des monocytes et des macrophages (Gude et al., 2008). La dernière étape de ce processus est la diapédèse, le mécanisme par lequel les cellules immunitaires traversent l'endothélium vasculaire (Engelhardt et Ransohoff, 2005). La diapédèse des leucocytes peut s'effectuer de manière paracellulaire, c'est-à-dire à travers des jonctions cellulaires inter-endothéliales, ou transcellulaire, c'est-à-dire directement à travers la cellule endothéliale. Avant de traverser la BHE, suite à leur adhésion ferme, les cellules immunitaires vont ramper le long de l'endothélium afin de trouver le lieu préférentiel pour migrer (Schenkel, Mamdough et Muller, 2004). Les leucocytes arrivent ainsi au niveau de la membrane basale où les MMP-9 (métalloprotéinases matricielles) agissent en augmentant la perméabilité endothéliale (Sellebjerg et Sorensen, 2003), et permettent aux leucocytes de poursuivre leur migration via le gradient de chimiokines (Man, Ubogu et Ransohoff, 2007).

La présence de la BHE dans le SNC rend la transmigration des cellules inflammatoires beaucoup plus difficile. Les monocytes utilisent exclusivement le mode de passage transcellulaire pour traverser la BHE (Carman, 2009). Sa présence peut apporter au mécanisme de recrutement des leucocytes dans le cerveau des caractéristiques qui diffèrent du système nerveux périphérique (SNP) où elle est absente. En effet, la diapédèse des leucocytes dans le SNC dure plusieurs heures, tandis que celle du SNP ne prend que quelques minutes (Wolburg, Wolburg-Buchholz et Engelhardt, 2005).

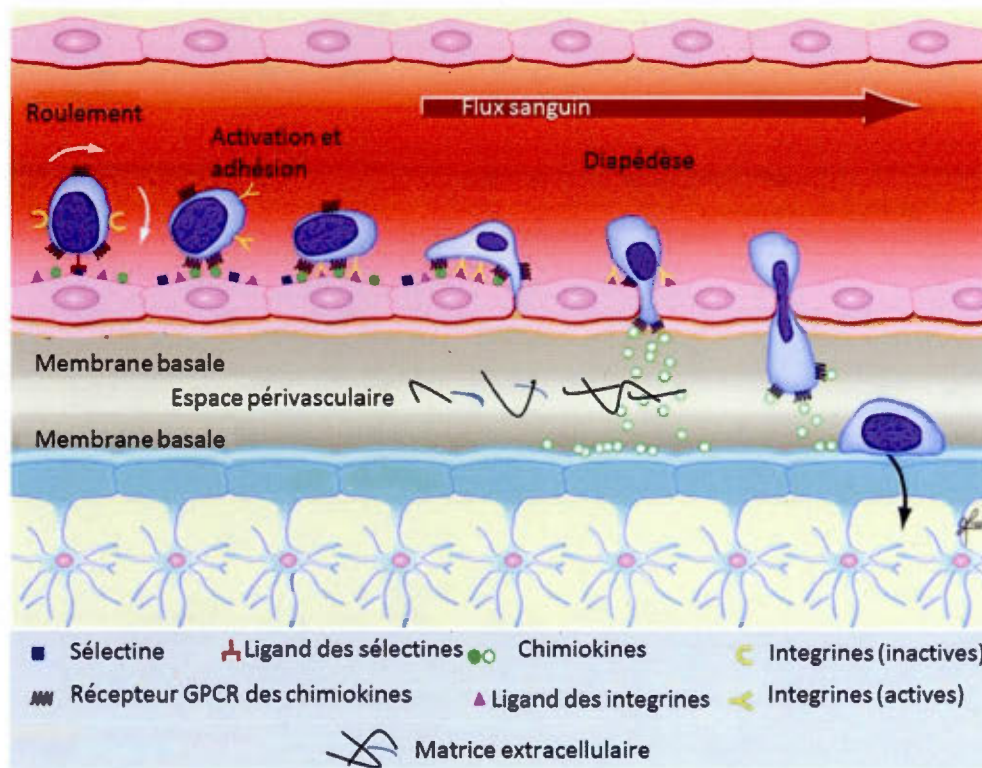


Figure 1.10. Le processus de la migration des leucocytes vers le SNC.

Ce processus commence par le roulement des leucocytes sur la paroi vasculaire. Ceux-ci sont ensuite activés et adhèrent à l'endothélium. Enfin, les leucocytes traversent cet endothélium par migration transcellulaire ou paracellulaire pour arriver dans l'espace périvasculaire où les matrices extracellulaires agissent et leur permettent de poursuivre leur migration via le gradient de chimiokines [adapté de (Man, Ubogu et Ransohoff, 2007)].

Les monocytes proviennent de la moelle osseuse et infiltrent le SNC pour se différencier en macrophages périvasculaires. Ces macrophages sont des cellules présentatrices d'antigènes qui jouent un rôle très important dans la régulation du système immunitaire du SNC (Hickey et Kimura, 1988). Le système SPHK/S1P joue un rôle très important dans la protection de ces cellules contre l'apoptose (Weigert, Weis et Brune, 2009). Les macrophages périvasculaires effectuent la phagocytose et la pinocytose en réponse à un

processus inflammatoire, à une blessure ou encore à une mort neuronale. Ils répondent aux cytokines ou au LPS dans le sang périphérique (Williams, Alvarez et Lackner, 2001). De ce fait, ces cellules sont impliquées dans plusieurs processus pathologiques tels que les maladies auto-immunes et les lésions nécrotiques du SNC, ou l'entrée de certains virus dans le SNC, dont le VIH (Stoll et Jander, 1999). En plus des cellules immunitaires périphériques, les cellules résidentes du SNC participent au processus inflammatoire.

1.3.4. Les cellules gliales

Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires résidentes du cerveau et sont considérées comme des macrophages résidents du SNC (Aloisi, 2001). Elles constituent environ 10% des cellules du SNC. Ces cellules représentent la première ligne de défense contre les lésions cérébrales, et surveillent de façon active leur environnement à la recherche des signaux inflammatoires. Lors des altérations cérébrales, les cellules microgliales répondent rapidement et deviennent activées (Hailer, 2008). Elles migrent et entourent les cellules mortes ou endommagées afin d'en phagocyter les débris cellulaires (Fetler et Amigorena, 2005). Une fois activées, les cellules microgliales ont la capacité de présenter des antigènes et interagissent avec les cellules immunitaires en provenance de la périphérie. Ces propriétés permettent l'initiation de la réaction inflammatoire locale par la production de cytokines pro-inflammatoires voir des éléments toxiques tels que l'oxyde nitrique (NO), et les espèces réactives à l'oxygène, le TNF α (*tumor necrosis factor- α*), et l'interleukine-1 β (IL-1 β) (Qin et al., 2007). Ces cytokines ont des effets neurotoxiques (Piani *et al.*, 1992). L'activation microgiale est caractérisée par des modifications de leur morphologie cellulaire, de leur nombre et de leur production de médiateurs inflammatoires (Streit, Walter et Pennell, 1999). En outre, la microglie peut agir sur les différentes étapes de la formation, de la maturation et de l'intégration fonctionnelle de nouveaux neurones (Butovsky et al., 2007). La microglie peut aussi sécréter un certain nombre de facteurs solubles, tels que le facteur neurotrophique dérivé des cellules gliales (GDNF) qui sont potentiellement bénéfiques pour la survie des neurones (Liu et Hong, 2003).

1.4. Rapport entre l'alimentation et le cancer

Des études épidémiologiques ont montré que 30% de tous les cancers sont liés à la nature du régime alimentaire des individus. La proportion de décès dus au cancer du système gastro-intestinal (œsophage, estomac, colon), qui est directement lié à l'alimentation, pourrait même atteindre 90%. Ils ont montré aussi qu'une forte consommation des fruits et des légumes provoque une diminution importante du risque de développer un cancer, surtout les cancers du système digestif (Béliveau et Gingras, 2007).

1.4.1. Les polyphénols

Les polyphénols constituent une famille de molécules très largement répandues dans le règne végétal où ils peuvent être localisés dans divers organes: racines, tiges, bois, feuilles, fleurs et fruit. Ils sont synthétisés par les plantes comme métabolites secondaires, ce qui signifie qu'ils n'exercent pas de fonctions directes au niveau des activités fondamentales de l'organisme végétal, comme la croissance ou la production (Pandey et Rizvi, 2009).

En se basant, d'une part sur le nombre d'atomes constitutifs et d'autre part sur la structure de squelette de base, les polyphénols sont classés en quatre catégories: les acides phénoliques, les flavonoïdes, les stilbènes et les lignanes. De plus, les flavonoïdes sont classés en six sous-classes: les flavonols, les flavones, les isoflavones, les flavanones, les anthocyanes et les flavanols (catéchines et proanthocyanes) (Manach *et al.*, 2004). De nos jours, ces composés sont largement étudiés pour leur capacité à améliorer la santé humaine. Ces analyses comprennent une grande variété d'études cliniques, épidémiologiques et nutritionnelles qui indiquent que les populations dont l'alimentation est riche en polyphénols sont moins sensibles aux maladies telles que les maladies cardiovasculaires et le cancer. De plus, ces composés ont des activités anti-virales, anti-oxydantes, anti-inflammatoires, et anti-cancéreuses (Arts et Hollman, 2005).

1.4.2. Les polyphénols du thé vert

Après l'eau, le thé est la boisson la plus populaire consommée au monde. Il est produit à partir des feuilles de la plante *Camellia sinensis*. La feuille du thé vert contient plus de 700 produits chimiques, dont les polyphénols sont les plus prédominants (Liu et al., 2011) (Figure 1.11).

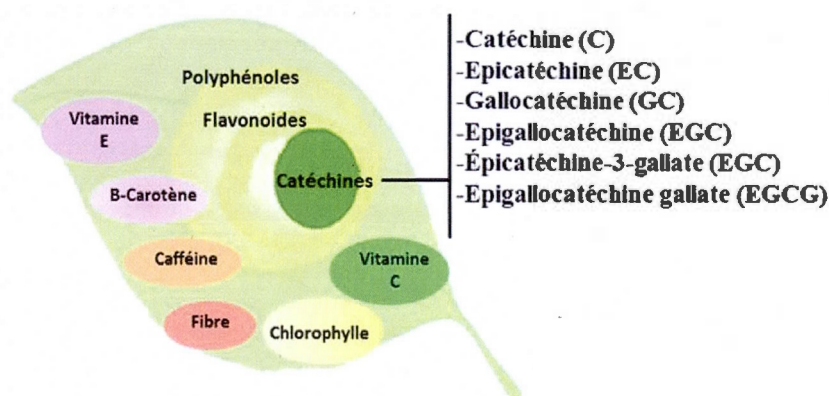


Figure 1.11. Contenu en catéchines des feuilles de thé vert

Les feuilles de thé vert sont composées de plusieurs molécules chimiques dont les plus prédominantes sont les flavonoïdes qui sont formés de six principales catéchines [adapté de <http://www.tokyofuturestyle.com/english/products/puregreen/>].

Il a été démontré que le thé vert exerce des actions majeures sur la réduction de l'incidence de certains types de cancer tels que le cancer de la peau, des poumons, de l'œsophage, de l'estomac, des seins et plusieurs autres (Khan et al., 2006). Des études ont montré jusqu'à 57 % de réduction de l'incidence du cancer colorectal chez les grands buveurs de thé. Peu de recherches ont été publiées en ce qui concerne l'effet préventif du thé vert sur les cancers du sang et la promotion des métastases via la perturbation de la BHE causée par les cellules immunes circulant. De plus, il a été montré que le thé vert permet de prévenir les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives (Cooper, Morre et Morre, 2005). Ces propriétés sont favorisées par les polyphénols, particulièrement les catéchines présentes dans les feuilles fraîches du thé vert, qui ne sont pas oxydées au cours de l'étape de fermentation

utilisée pour la fabrication du thé noir (Béliveau et Gingras, 2007). Les principales catéchines du thé vert sont : (-)-épigallocatechine-3-gallate (EGCG), (-)-épigallocatechine (EGC), (-)-épicatechine-3-gallate (ECG), (-)-épicatechine (EC), catéchine (C) et gallocatechine (GC) (Zaveri, 2006) (figure 1.12). L'EGCG est la catéchine la plus abondante dans le thé vert. Une tasse de thé vert infusé contient 100 à 150 mg des catéchines dont 50% d'EGCG (Di Domenico *et al.*, 2012). La teneur d'EGCG libérée par l'infusion des feuilles varie selon plusieurs conditions telles que le lieu de culture, la diversité des plantes utilisées, la saison de récolte ainsi que les procédés de fabrication (Béliveau et Gingras, 2007).

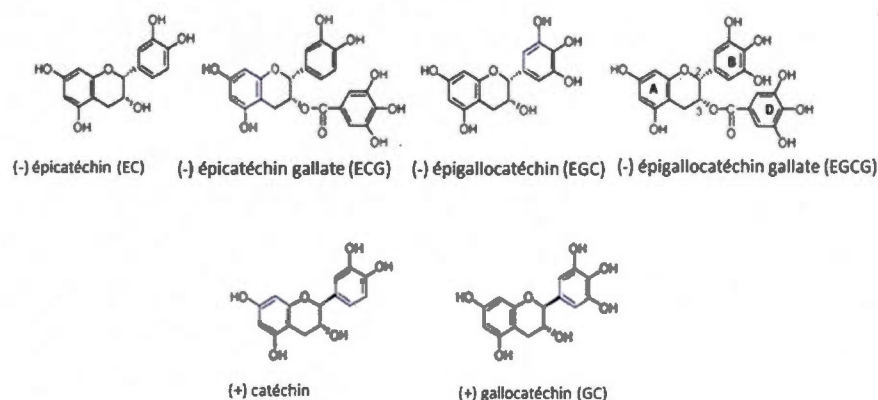


Figure 1.12. Structures moléculaires des catéchines du thé vert. [Tiré de (Zaveri, 2006)]

1.4.3. L'épigallocatechine gallate

La majorité des effets biologiques du thé vert sont attribués à l'EGCG. La structure gallate de l'EGCG (figure 1.13) lui confère un fort pouvoir antioxydant, et lui permet d'inactiver les radicaux libres et de chélater certains ions (Zaveri, 2006). Hormis son effet antioxydant, il a été démontré que l'EGCG est également impliqué dans plusieurs mécanismes cellulaires ciblés dans le cancer, dont la survie et la mort cellulaire. L'EGCG inhibe la prolifération (Asano *et al.*, 1997) et induit l'apoptose des cellules tumorales (Hibasami *et al.*, 1998). Des études ont montré que cette catéchine peut inhiber l'activité urokinase, l'activation des MAPKs (Jankun *et al.*, 1997), de la lipooxygénase, et l'activité

cyclooxygénase dans les cellules tumorales (Stoner and Mokhtar 1995). L'EGCG possède des propriétés anti-angiogéniques en bloquant l'activation du récepteur au VEGF à la surface des cellules (Lamy, Gingras et Beliveau, 2002) ou en affectant la transcription de certains gènes (Chen et Zhang, 2003). Les effets anticancéreux de l'EGCG sont attribués à sa fixation au récepteur à la laminine de 67 KD (Umeda *et al.*, 2008).

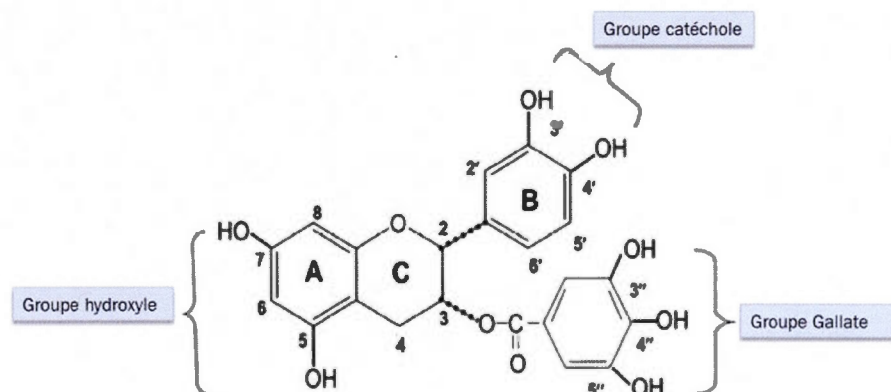


Figure 1.13. Structure chimique de l'EGCG

[Adapté de <http://www.ssnp.ovh.org/zielonaherbata.html>]

1.5. Modèle cellulaire : Les cellules promyélomonocytaires HL-60

Les cellules HL-60 sont des cellules promyélomonocytaires leucémiques humaines qui ont été isolées d'une femme atteinte de la leucémie myéloïde aiguë. Elles prolifèrent en suspension dans leur milieu de culture en se dédoublant dans un temps qui varie de 36 à 48 heures (Collins, 1987). Des analyses cytogénétiques des cellules HL-60 ont montré l'apparition de plusieurs anomalies chromosomiques à savoir : la monosomie, la trisomie, la tétrasomie, ainsi qu'une variété de translocations chromosomiques. La première altération génétique observée dans les cellules HL-60 était l'amplification d'environ 30 fois du gène *c-myc* (Dalla-Favera, Wong-Staal et Gallo, 1982). Les cellules HL-60 sont utilisées dans

plusieurs études concernant la différenciation spécifique des cellules myéloïdes. Sous l'action de plusieurs agents, ces cellules peuvent se différencier en une variété de lignées cellulaires. L'ajout du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou de l'acide rétinoïque tout-trans (ATRA) induit leur différenciation en granulocytes (Collins, 1987). L'exposition à la vitamine D3 (1,25 dihydroxyvitamine D3) permet aux cellules de se différencier en monocytes. Des cellules «*macrophages-like*» sont obtenues après la différenciation des cellules HL-60 par un promoteur de tumeurs, le phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Beltran, Peek et Chang, 2006). Ces cellules sont appelées «*macrophages-like*» car elles comportent des caractéristiques phénotypiques, enzymatiques, et histochimiques semblables aux cellules monocytaires. Le PMA agit en se liant à la protéine kinase C (PKC), qui joue un rôle dans la transduction des signaux extracellulaires à travers la membrane cellulaire (Collins, 1987). Les cellules traitées par le PMA adhèrent au flacon de culture avec la formation de pseudopodes et perdent leur capacité à proliférer (Figure 1.14) (Brock, Huang et Ingber, 2003). Il a été montré que la différenciation macrophagique se caractérisait par une sécrétion accrue de la MMP-9 (Annabi *et al.*, 2007 ; Vezina, Chokor et Annabi, 2012).

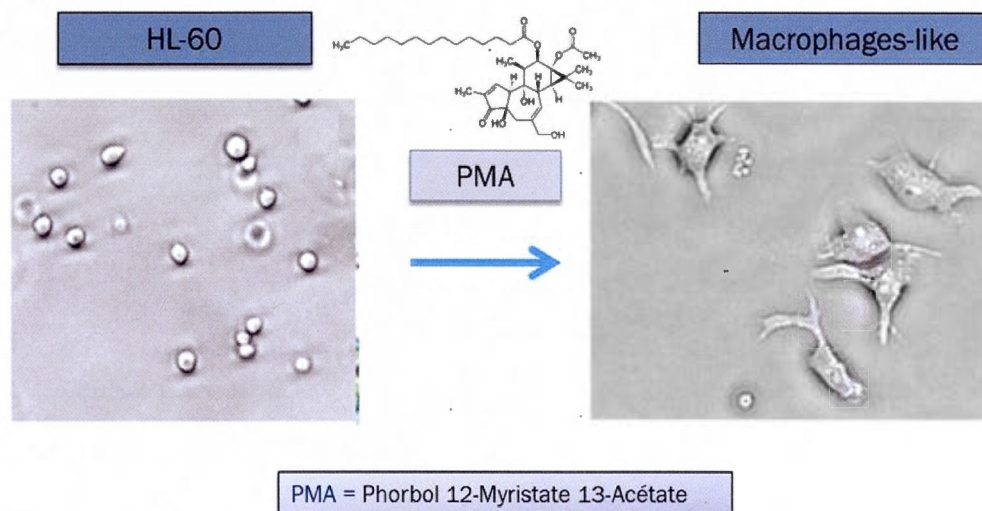


Figure 1.14. Différenciation des cellules HL-60

Les cellules HL-60 se différencient en « macrophages-like » sous l'action du PMA. Les cellules différenciées adhèrent au pétri de culture en s'étendant et en formant des pseudopodes. [Adapté de (Brock, Huang et Ingber, 2003)]

CHAPITRE II

PROJET DE RECHERCHE

2.1. Hypothèse et objectifs

La sphingosine kinase (SPHK) est l'un des biomarqueurs oncogéniques le plus exprimé dans la tumeur cérébrale ou le glioblastome. Effectivement, cette enzyme catalyse la synthèse de la sphingosine-1-phosphate (S1P) en phosphorylant la sphingosine. La S1P est impliquée dans de nombreux processus cellulaires se traduisant par de multiples modulations physiologiques et physiopathologiques. Ainsi, elle est connue pour sa capacité à promouvoir la neuroinflammation dans le cancer du cerveau. Plus particulièrement, elle joue un rôle important dans la chimiotaxie et le trafic des cellules immunitaires et ceci leur permet de traverser la BHE. La S1P est le ligand d'une famille de récepteurs membranaires formée de cinq récepteurs à la S1P (S1P1-5). Cependant, le rôle de la S1P dans le recrutement des macrophages à travers la BHE est peu connu. Nous évaluerons l'impact de la liaison S1P/S1PR sur les voies de signalisation MAPK à diverses étapes de la différenciation des cellules HL-60 en «macrophages-like», et nous émettons l'hypothèse que cette activation peut être modulée par l'EGCG, une molécule naturelle dérivée de notre diète et possédant des propriétés chimiopréventives (figure 2.1).

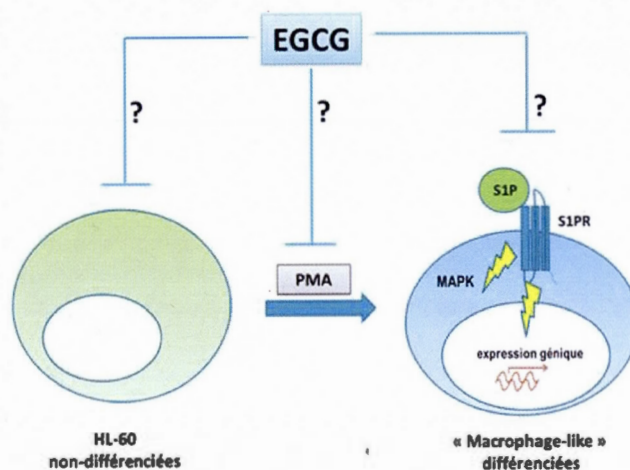


Figure 2.1. Voie ciblée par notre hypothèse de travail qui concerne l'effet de l'EGCG sur les voies de signalisation induites par la S1P à divers stades de la différenciation.

La molécule dérivée de notre diète et ayant des propriétés chimiopréventives- l'épigallocatechine gallate (EGCG)- peut moduler la régulation transcriptionnelle des récepteurs de la S1P associés à la différenciation des cellules promyélocyaires HL-60 en macrophages.

Les objectifs de notre étude sont :

1. Identifier les récepteurs de la S1P qui sont exprimés et modulés suite à la différenciation des cellules HL-60 en macrophages.
2. Étudier l'effet de l'EGCG sur la régulation transcriptionnelle des récepteurs de la S1P associés à la différenciation des HL-60 en macrophages.

2.2. Protocole expérimental

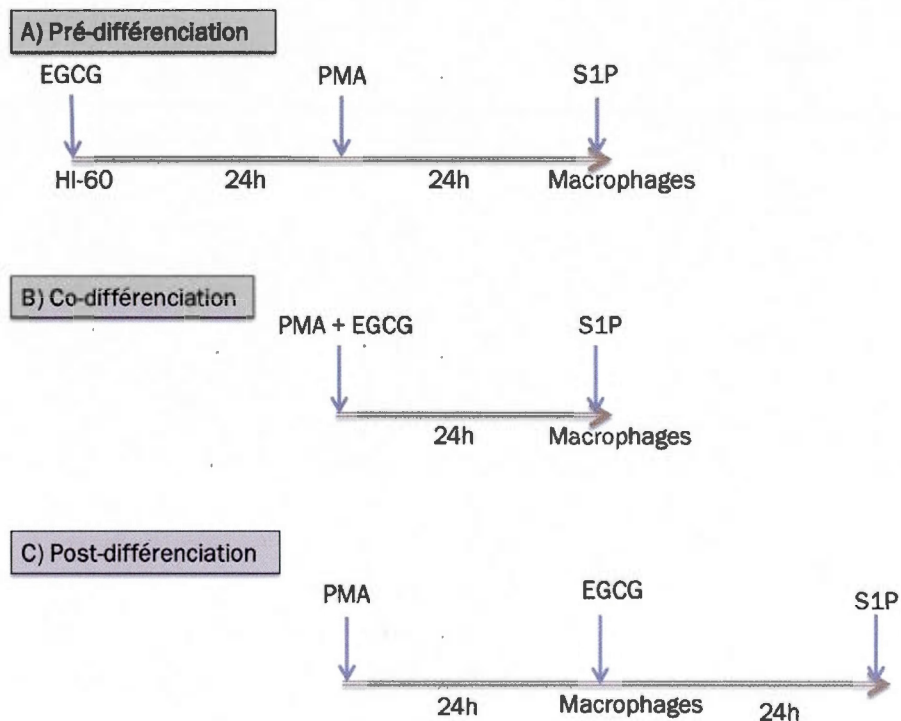


Figure 2.2 Schéma récapitulatif des trois conditions de traitement.

A) Condition de pré-différenciation : Les cellules HL-60 sont prétraitées par l'EGCG pendant 24h, suivi d'un traitement de 24h avec le PMA. Les cellules se différencient et deviennent des macrophages. Enfin, nous stimulons les macrophages avec la S1P. B) Condition de co-différenciation : Les cellules HL-60 sont traitées simultanément avec le PMA et l'EGCG. Après, les macrophages sont ensuite stimulés avec la S1P. C) Condition de post-différenciation : Nous prétraitons les cellules avec le PMA pour les différencier. Après 24h nous traitons les macrophages avec l'EGCG pour un autre 24h. Enfin, nous stimulons les macrophages avec la S1P.

CHAPITRE III

EGCG INHIBITS S1P2 GENE EXPRESSION AND PREFERENTIALLY ABROGATES SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE-MEDIATED SIGNALING IN UNDIFFERENTIATED HUMAN HL-60 PROMYELOMONOCYTIC LEUKEMIA CELLS.

Rima Chokor, Sylvie Lamy and Borhane Annabi

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Centre de recherche BIOMED, Département de
Chimie, Université du Québec à Montréal, Quebec, Canada

Correspondence should be directed to :

Borhane Annabi, PhD, Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, Université du Québec à
Montréal, C.P. 8888, Succ. Centre-ville, Montréal, Québec, Canada, H3C 3P8; Phone : (514)
987-3000 ext 7610; Fax : (514) 987-0246; E-mail : annabi.borhane@uqam.ca

Key words : Chemoprevention, Green tea EGCG, Neuroinflammation, Blood-brain barrier,
S1P

Abbreviations : BBB, blood-brain barrier; CNS, central nervous system; EGCG,
epigallocatechin-3-gallate; PMA, phorbol-12-myristate 13-acetate ; S1P, sphingosine-1-
phosphate; SPHK, sphingosine kinase

ABSTRACT

Macrophage chemotaxis followed by blood-brain barrier (BBB) transendothelial migration are believed to be associated with inflammation in the central nervous system. Anti-neuroinflammatory strategies have identified the dietary-derived epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as an efficient agent to prevent neuroinflammation-associated neurodegenerative diseases by targeting pro-inflammatory mediator signaling. Given that high levels of sphingosine kinase, and of its product sphingosine-1-phosphate (S1P), are present in brain tumors, we tested whether EGCG may prevent the S1P response in terminally-differentiated macrophages. Promyelomonocytic HL-60 cells were differentiated into macrophages and S1P triggered phosphorylation in ERK, JNK, and P38 MAPK intracellular signalling as shown by Western blotting analysis. Pretreatment of cells with EGCG prior to differentiation inhibited the response to S1P in all three pathways, while EGCG abrogated P38 MAPK phosphorylation when present only during differentiation. Terminally-differentiated macrophages were, however, insensitive to EGCG treatment. Using real-time PCR, expression of the S1P receptors S1P1, S1P2, and S1P5 were predominantly induced in terminally-differentiated macrophages, while the S1P2 was decreased by EGCG treatment. Our data suggest that diet-derived EGCG achieves efficient effects as a preventive agent targeting signalling pathways prior to cell terminal differentiation. Such properties could impact on cell chemotaxis through the BBB and prevent cancer-related neuroinflammation.

INTRODUCTION

Accumulating evidence suggests that neuroinflammation strongly correlates with, and characterizes, neurodegenerative processes associated with central nervous system (CNS) disorders. Those inflammatory events occur at the blood-brain barrier (BBB) in diseases such as multiple sclerosis, epilepsy and Alzheimer's disease (Trippier *et al.*, 2013). Inflammatory response in the CNS is known to mobilize different types of immune cells including macrophages, mast cells, T and B lymphocytes and dendritic cells, as well as CNS-resident cells such as microglia, astrocytes and neurons (Ransohoff et Brown, 2012). During neuroinflammation, responses to pro-inflammatory cues and subsequent chemotaxis therefore represent important events in the recruitment of these cells to the CNS (Chavarria et Alcocer-Varela, 2004). As a consequence of pro-inflammatory growth factors or cytokines-mediated intracellular signalling, passage through the BBB endothelium allows these cells to reach the site of inflammation. If this process is not controlled, the prolonged inflammation can then be the cause of important cerebral damage.

Inflammation has also been closely linked to various forms of cancer, and particularly to brain tumor development (King et Khalili, 2001 ; Tafani *et al.*, 2011). Very little is, however, known about the role of inflammation in glioma, especially at the initiation stage. It has been suggested that bi-directional communications between immune cells and glioma cells creates an immunosuppressed microenvironment that promotes tumor survival and growth (Galvao et Zong, 2013). Such potential tumor-initiating roles of inflammation in glioma prompted researchers to develop several immunotherapy approaches in order to reverse glioma development and progression and its ability to evade the immune system. In one example of this, glioma secrete high levels of the bioactive lipid sphingosine-1-phosphate (S1P) (Hoelzinger, Demuth et Berens, 2007), and high expression levels of the enzyme that forms S1P sphingosine kinase (SPHK)-1 correlate with shorter survival time for glioblastoma multiforme patients (Van Brocklyn *et al.*, 2005). Furthermore, S1P is a biologically active metabolite of plasma-membrane sphingolipids that are essential for immune-cell trafficking. Much of the immune function of S1P results from the engagement of a family of 5 G-protein-coupled receptors (S1P1-5). Recent findings on the role of S1P in immunosurveillance

support regulatory mechanisms in S1P-mediated immune-cell trafficking and suggests that any perturbation in the interactions between S1P and its receptors may affect immunity (Rivera, Proia et Olivera, 2008).

Recently the anti-inflammatory activity of plant and diet-derived compounds, most of them belonging to the chemical groups of alkaloids, coumarins, flavonoids, polyphenols and terpenoids, was demonstrated (Anand *et al.*, 2008 ; Chen *et al.*, 2011). Although flavonoids have been used in inflammatory pathway targeting (Luqman et Pezzuto, 2010 ; Prasad *et al.*, 2010), it is not known how these may modulate the recruitment and infiltration of macrophages into the tumour in which the microenvironment subsequently activates them to support the malignant progression of cancer cells. Being the most potent secreted matrix metalloproteinase (MMP) to permeate the BBB (Lakhan *et al.*, 2013), MMP-9 has been ascribed a crucial role and provided the molecular rationale explaining how the disruption of the BBB (Feng *et al.*, 2011a ; Feng *et al.*, 2011b), and how subsequent transendothelial migration of terminally-differentiated HL-60 macrophages occur (Seidel *et al.*, 2011). Collectively, these processes are thought to lead to cerebral infections and development of brain pathologies. However, while green tea-derived epigallocatechin-gallate (EGCG) still efficiently inhibited inflammation biomarker cyclooxygenase (COX)-2, it was unable to inhibit MMP-9 secretion in differentiated-macrophages (Vezina, Chokor et Annabi, 2012).

Given the selective biomarkers targeting of EGCG, we questioned whether pro-oncogenic-mediated differentiation of human HL-60 promyelomonocytic leukemia cells into macrophages affected the cellular response to EGCG. In the current study, we therefore explored the capacity of diet-derived EGCG to prevent S1P-mediated signalling which could possibly contribute to macrophage mobilization through the BBB.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Sodium dodecylsulfate (SDS) and bovine serum albumin (BSA) were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON). Cell culture media was obtained from Life Technologies (Burlington, ON). Electrophoresis reagents were purchased from Bio-Rad (Mississauga, ON). The HyGLO™ chemiluminescent HRP antibody detection reagents were from Denville Scientific Inc. (Metuchen, NJ). Micro bicinchoninic acid protein assay reagents were from Pierce (Rockford, IL). The polyclonal antibodies against ERK, P-ERK, JNK, P-JNK, P38 and P-P38 were all purchased from Cell Signaling (Danvers, MA). Horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit and anti-mouse IgG secondary antibodies were from Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). EGCG was from MP Biomedicals (Solon, OH). All other reagents were from Sigma-Aldrich Canada.

Cell culture

The HL-60 promyelomonocytic cell line was purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA) and maintained in Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco Invitrogen Cell Culture Systems, Burlington, ON) containing 20% (v/v) fetal bovine serum (FBS) (HyClone Laboratories, Logan, UT), 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin, and were cultured at 37°C under a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The tumor-promoting agent phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) was used to trigger macrophage differentiation. Slides of PMA-treated HL-60 cells were then mounted for light microscopy and air-dried, stained with Diff-Quick (Baxter Healthcare Corp., Miami, FL) and examined for morulae as previously validated (19). Given that numerous protocols can be found in the literature to differentiate resting HL-60 cells into "macrophage-like cells" using PMA (between 2 to 8 days with various PMA concentrations, alone or in combination with other molecules), we wish to emphasize that, throughout the text the "HL-60 macrophage differentiation" condition represents the adherent subpopulation of HL-60 cells immediately harvested upon PMA treatment. We use "terminally-differentiated macrophages" to refer to those same adherent cells, which were subsequently maintained in culture for another 24-48 hours.

Immunoblotting procedures

Proteins from control and treated cells were separated by SDS-PAGE. After electrophoresis, proteins were electrotransferred to polyvinylidene difluoride membranes which were then blocked for 1 hr at room temperature with 5% non-fat dry milk in Tris-buffered saline (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) containing 0.3% Tween-20 (TBST). Membranes were further washed in TBST and incubated with the primary antibodies (1/1,000 dilution) in TBST containing 3% bovine serum albumin and 0.1% sodium azide, followed by a 1 hr incubation with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgG (1/2,500 dilution) in TBST containing 5% non-fat dry milk. Immunoreactive material was visualized by chemiluminescence.

Total RNA isolation, cDNA synthesis and real-time quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from cell suspensions or monolayers using TriZol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD). For cDNA synthesis, 2 µg of total RNA were reverse-transcribed using a high capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA). cDNA was stored at -80°C prior to PCR. Gene expression was quantified by real-time quantitative PCR using iQ SYBR Green Supermix (Bio-Rad, Hercules, CA). DNA amplification was carried out using an Iq5 (Bio-Rad, Hercules, CA) and product detection was performed by measuring binding of the fluorescent dye SYBR Green I to double-stranded DNA. The following QuantiTect primer sets were obtained from Qiagen (Valencia, CA) : S1P1 (QT00208733), S1P2 (QT00230846), S1P3 (QT00244251), S1P4 (QT01192744), S1P5 (QT00234178). GAPDH primer sets were synthesized by Biocorp (Dollard-des-Ormeaux, QC) with the following sequences: forward CCATCACCATCTTCCAGGAG and reverse CCTGCTTCACCACTTCTTG. The relative quantities of target gene mRNA compared against two internal controls, GAPDH and β -Actin mRNA, were measured by following a ΔC_T method employing an amplification plot (fluorescence signal vs. cycle number). The difference (ΔC_T) between the mean values in the triplicate samples of target gene and those of GAPDH and β -actin mRNAs were calculated by iQ5 Optical System Software version 2.0 (Bio-Rad, Hercules, CA) and the relative quantified value (RQV) was expressed as $2^{-\Delta C_T}$.

Statistical data analysis

Unless otherwise stated, data are representative of three or more independent experiments. Statistical significance was assessed using Student's unpaired *t*-test. Probability values of less than 0.05 were considered significant and an asterisk identifies such significance in the figures. Error bars in all figures represent standard error of the mean (SEM) values.

RESULTS

PMA triggers promyelocytic HL-60 cell differentiation into adherent macrophages

Among the agents shown to induce differentiation of HL-60 cells, the tumor-promoting agent phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) triggers a terminal differentiated monocytic/macrophage phenotype (20). Here, we treated HL-60 cells with increasing concentrations of PMA for 24 hours, then discarded any cells that remained in suspension and took phase contrast pictures (Fig.1A). We validated that the optimal dose of PMA that triggered optimal cell adhesion was 3 μ M (Fig.1B). Finally we demonstrated by zymography increased secretion of the matrix metalloproteinase (MMP)-9, characteristic of the adhesive phenotype of terminally-differentiated macrophages, in agreement with previous reports (Annabi *et al.*, 2007 ; Vezina, Chokor et Annabi, 2012).

Macrophage differentiation correlates with significant increases in S1P1, S1P2, and S1P5 gene expression

We next evaluated the gene expression profiles of the S1P receptor family in macrophage/monocyte terminally-differentiated HL-60 cells. Promyelocytic HL-60 cells were treated with increased PMA concentrations, total RNA extracted from adherent cells, and cDNA synthesis performed as described in the Methods section. We first validated that each of our specific primer sets amplified a single amplicon corresponding to the S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, and S1P5 genes as seen on an ethidium bromide-stained agarose gel (Fig.2A). Quantitative PCR then allowed us to assess the extent of changes in gene expression; we concluded that S1P1, S1P2, and S1P5 were significantly increased in adherent cells, while only moderate increases were observed for S1P3 and S1P4 (Fig.2B). Collectively, these results suggest that macrophage-like cells could be responsive to S1P.

S1P triggers rapid intracellular signaling through multiple pathways in macrophage-differentiated HL-60 cells

In order to assess whether differentiated HL-60 cells were capable of responding to S1P, we measured the extent of phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK) and c-Jun N-terminal kinase

(JNK). We observed that S1P rapidly triggered the phosphorylation of all the above-mentioned signalling intermediates (Fig.3A, C, E) typically reaching an optimal effect between 30 seconds and 1 minute of stimulation (Fig.3B, D, F).

EGCG pretreatment of promyelocytic HL-60 inhibits S1P response in macrophage-differentiated HL-60 cells

We next assessed the potential ability of EGCG to affect the S1P cellular response. To this end, we evaluated EGCG effects either prior (pre-differentiation) to inducing HL-60 cells differentiation with PMA, simultaneously (co-differentiation) with HL-60 differentiation, or on cells that were already differentiated (post-differentiation). Cell lysates were isolated following stimulation with S1P and the extents of ERK, P38 MAPK, and JNK phosphorylation were evaluated by Western blotting (not shown). Scanning densitometry of the autoradiograms showed that PMA-differentiated cells which had been pre-treated with EGCG had an abrogated global S1P response as ERK, P38 MAPK, and JNK phosphorylation were inhibited (Fig.4A-C). When EGCG had been added to cells simultaneously with PMA, only the S1P-mediated phosphorylation of P38 MAPK was inhibited (Fig.4D-F). Finally, when EGCG was added to terminally-differentiated cells none of the S1P-induced phosphorylated intermediates were diminished (Fig.4G-I). Altogether, these observations suggest that EGCG efficiently prevents subsequent responses to S1P in macrophages, while it selectively abrogates the cell response during differentiation and is completely inefficient in terminally-differentiated cells.

EGCG selectively alters S1P receptors gene expression in macrophage-differentiated HL-60 cells

We next examined whether expression of the induced S1P1, S1P2, or S1P5 genes were affected by EGCG. Total RNA was extracted from cells treated as described above and gene expression assessed by qPCR. EGCG was found to only significantly downregulate S1P2 gene expression in pre- and co-differentiation conditions while it did not alter the increased expression of all three receptors in the post-differentiation condition (Fig.5).

DISCUSSION

The BBB concept, originally suggested to limit access of blood-borne immune cells into the healthy CNS (Miller, 1999 ; Perry *et al.*, 1997), has now been challenged by demonstration of leukocytes penetration and by increased recruitment of microglia which resemble immature antigen-presenting cells (Persidsky, 1999). Less documented are secreted factors that may contribute to such recruitment and enable modulation of the immunosuppressive environment of glioma. While factors such as TGF- β , COX-2 and IL-10 have been suggested to contribute to the recruitment and expansion of regulatory T cells (Rolle, Sengupta et Lesniak, 2012), we now provide new evidence that S1P, which can originate from brain tumor cells where SPHK1 is highly expressed, can also be a major actor in the regulation of undifferentiated and terminally-differentiated macrophage functions. Given that recruitment of macrophages plays a critical role in cancer and tumor angiogenesis (Mantovani *et al.*, 2010 ; Murdoch *et al.*, 2008), we hypothesized that diet-derived molecules, such as the green tea-derived polyphenol EGCG, could sustain pharmacological intervention targeting cell transformation, affect S1P-mediated signalling through various cell differentiation processes, and ultimately prevent the brain tumor pro-inflammatory phenotype occurrence.

Chemopreventive assessment of EGCG has, in fact, established this class of diet-derived molecule as a signal transduction inhibitor. In support of this, a screening of 89 NF- κ B-regulated genes was performed in carcinogen-induced macrophage differentiation of HL-60 cells where several gene expression profiles were found to be induced during the cell differentiation, immune response, and inflammation functions and to be significantly reversed by EGCG (Vezina, Chokor et Annabi, 2012). In the current study, we confirm that S1P effectively triggers multiple signaling cascades, in agreement with previous reports (Taha, Argraves et Obeid, 2004) in both undifferentiated and terminally-differentiated macrophages. We show that the S1P receptor expression profile was significantly inducible upon macrophage differentiation for S1P1, S1P2, and S1P5, with very marginal inductions for S1P3 and S1P4. Finally, this expression profile was found altered by EGCG only for S1P2 under both pre-differentiation and co-differentiation treatment conditions. More

importantly, the inhibition by EGCG of ERK, JNK, and P38 MAPK signaling pathways in the pre-differentiation condition could be explained by either direct downstream targeting of each S1P receptor, or by the reduced S1P2 receptor expression that we report (Fig.6A) and which perfectly matches those functions reported for S1P2 (Taha, Argraves et Obeid, 2004). Interestingly, although S1P2 expression remained reduced in the co-differentiation condition, EGCG was unable to inhibit S1P-mediated ERK and JNK phosphorylation (Fig.6B) suggesting that those two pathways may be relayed through an S1P receptor signaling functions (Taha, Argraves et Obeid, 2004) and whose expression is not affected by EGCG, as in the case for S1P1 and S1P5 in the current study. S1P2 downstream functions remain controversial as they relay both a repressive signal in macrophage recruitment (Michaud, Im et Hla, 2010), while they also potentiate human lung fibroblast chemotaxis (Hashimoto *et al.*, 2008). Given that terminally-differentiated macrophages (post-differentiation condition) became unresponsive to EGCG inhibition (Fig.6C), it becomes tempting to suggest that efficient EGCG impact can only be achieved in a chemopreventive context where tumor-derived growth factors-mediated chemotaxis, such as can be triggered by S1P, could still be abrogated.

S1P fulfills tasks in the immune system through auto- and/or paracrine mechanisms, ultimately regulating macrophage trafficking (Gude *et al.*, 2008 ; Schwab et Cyster, 2007). Accordingly, our current assessment of S1P responsiveness in all pre-, co-, and post-differentiation conditions will shed light and impact on events in macrophage biology such as apoptosis, migration and cell proliferation (Weigert, Weis et Brune, 2009), but will require further investigation. In our cellular model, S1P treatment was reported to not induce macrophage cell death (Weigert, Weis et Brune, 2009). Therefore, the impact of S1P signalling and of its inhibition by EGCG can be anticipated on mechanisms involved in cell proliferation and/or chemotaxis. Interestingly, modern approaches in cancer therapy are currently aimed at neutralizing cancer stem cell responsiveness to circulating growth factors (Wu, Huang et Chang, 2008). To this end, a CD133(+) cell population isolated from U87 glioblastoma cells was recently shown to be highly responsive to S1P signalling and to require the cooperation of MT1-MMP (Annabi *et al.*, 2009), a cell surface matrix metalloproteinase shown to be efficiently targeted by EGCG (Annabi *et al.*, 2002 ;

Yamakawa *et al.*, 2004). Whether such cooperative MT1-MMP to S1P signaling is physiologically relevant was further explored in alternate circulating cell models such as T cells (Savinov *et al.*, 2013) and bone marrow-derived mesenchymal stromal cells (Zgheib, Lamy *et al.*, 2013) where MT1-MMP functions were targeted by EGCG. Evidence possibly supporting such a cooperative MT1-MMP/S1P signaling axis was recently based on the fact that S1P induced the association of MT1-MMP with p130Cas in endothelial cells (Gingras *et al.*, 2008) and that this interaction represents a novel mechanism in the macrophage cell fusion machinery (Gonzalo *et al.*, 2010).

In conclusion, the fact that only 5-10% of all cancer cases are due to genetic defects and that the remaining 90-95% are due to environment and lifestyle provides opportunities for preventing cancer (Anand *et al.*, 2008). Accordingly, among the various phytochemicals identified in fruits, vegetables, spices and grains which exhibit chemopreventive potential, our current study on the impact of EGCG clearly demonstrates its capacity to act in preventive rather than therapeutic settings. Given the lack of EGCG action on S1P-mediated signaling in terminally-differentiated macrophages (Fig.6C), one possible explanation may be provided by the downregulation of the putative 67LR EGCG receptor (Vezina, Chokor *et al.*, 2012). Such adaptive processes may, in part, explain the molecular basis for the cancer-preventive activity of EGCG prior to oncogenic cell transformation in response to carcinogens, and will help in the promotion of new diet strategies to prevent brain tumor-associated neuro-inflammation, in part, consequent to macrophage infiltration of the CNS.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was funded by the “Chaire de Recherche en Prévention et Traitement du Cancer”.

FIGURES

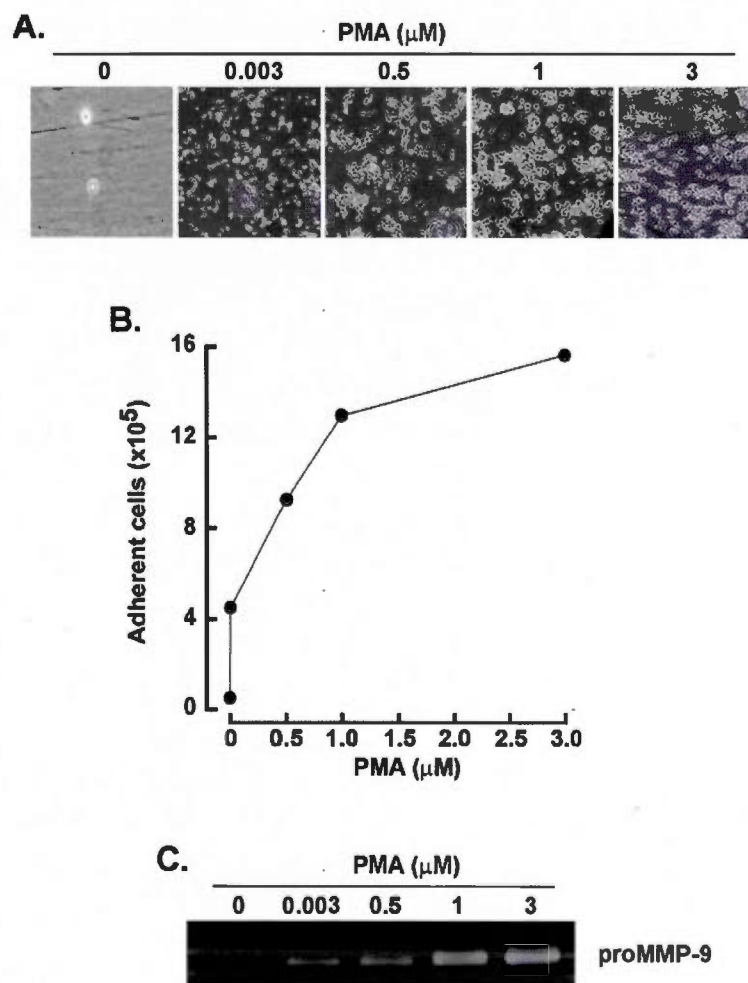


Fig.3.1: PMA triggers promyelocytic HL-60 cell differentiation into adherent macrophages. Serum-starved HL-60 cells in suspension (10^6 cells /flask) were treated with various PMA concentrations for 18 hrs. (A) Cells that remained in suspension were discarded, phase contrast pictures were taken of the macrophage-differentiated adherent cells, and (B) the numbers of adherent cells per well counted. (C) Conditioned media were also collected from each condition, and gelatin zymography was performed as described in the Methods section.

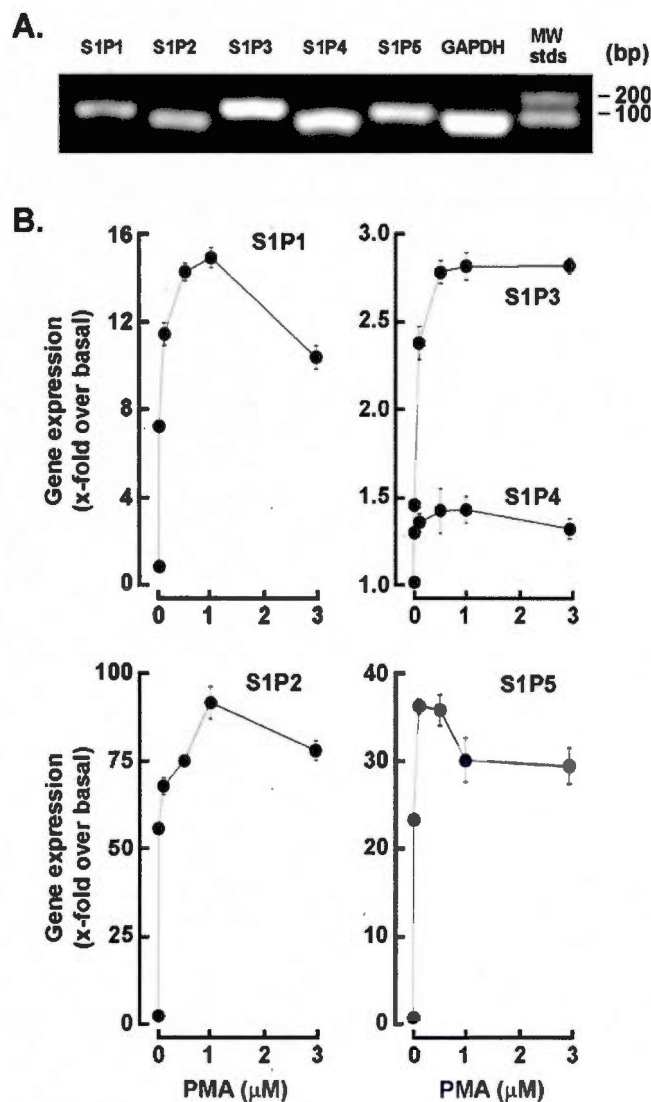


Fig.3.2: Macrophage differentiation correlates with significant increases in S1P1, S1P2, and S1P5 gene expression. Serum-starved HL-60 cells were treated for 18 hours with 3 mM PMA to induce HL-60 cell differentiation and adhesion. Total RNA was then isolated from adherent cells, transcribed into cDNA and qRT-PCR was performed to assess the expression of the S1P receptors S1P1, S1P2, S1P3, S1P4, and S1P5 as described in the Methods section. (A) A representative agarose gel electrophoresis is shown to confirm the generation of single amplicons. (B) A representative gene expression quantification is shown for each of the 5 genes assessed.

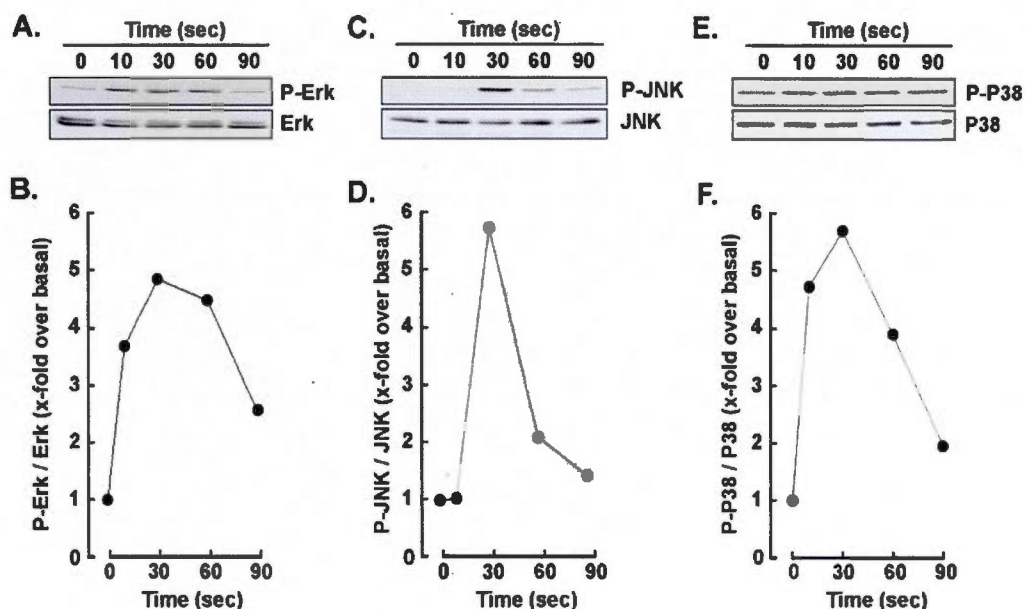


Fig.3.3: SIP triggers rapid intracellular signaling through multiple pathways in macrophage-differentiated HL-60 cells. Serum-starved HL-60 cells were treated for 18 hours with 3 mM PMA to induce HL-60 cell differentiation and adhesion. Adherent cells were then treated with 1 mM SIP for up to 1.5 minutes, following which cell lysates were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetected for (A) P-ERK, ERK, (C) P-JNK, JNK, (E) P-P38, and P38 proteins as described in the Methods section. Quantification was performed by scanning densitometry of the autoradiograms (B, D, F).

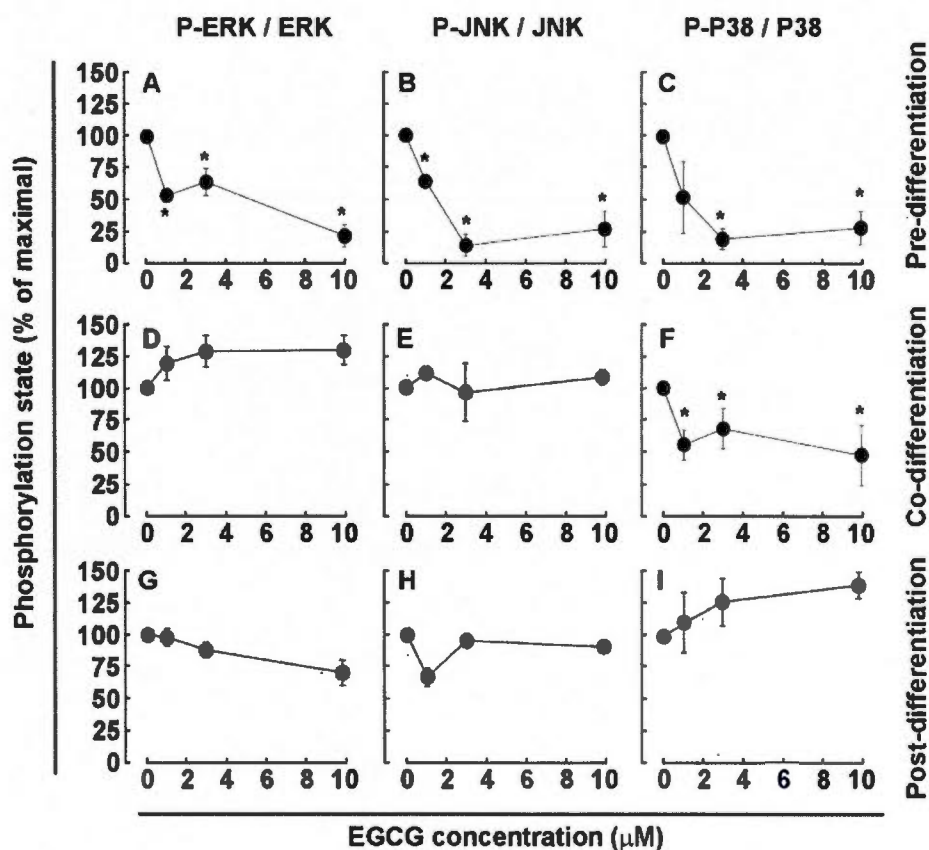


Fig.3.4: EGCG pretreatment of promyelocytic HL-60 inhibits S1P response in macrophage-differentiated HL-60 cells. Three different conditions were used to evaluate the EGCG impact on the S1P response. Pre-differentiation conditions: serum-starved HL-60 cells were treated for 24 hours with various concentrations of EGCG (0-10 mM), then treated for 18 hours with 3 mM PMA to induce HL-60 cell differentiation and adhesion. Co-differentiation conditions: serum-starved HL-60 cells were treated for 18 hours with either 3 mM PMA alone or with a combination of 3 mM PMA and various EGCG concentrations. Post-differentiation conditions: serum-starved HL-60 cells were treated for 18 hours with 3 mM PMA, then adherent cells were treated for 24 hours with various EGCG concentrations. In all three conditions, adherent cells were then treated with 1 mM S1P for 30 seconds, then cell lysates were isolated, electrophoresed via SDS-PAGE and immunodetection performed as in Fig.3. Scanning densitometry of the autoradiograms was performed and ratios of P-ERK/ERK, P-JNK/JNK, and P-P38/P38 were obtained. The data shown is representative of 3 independent experiments.

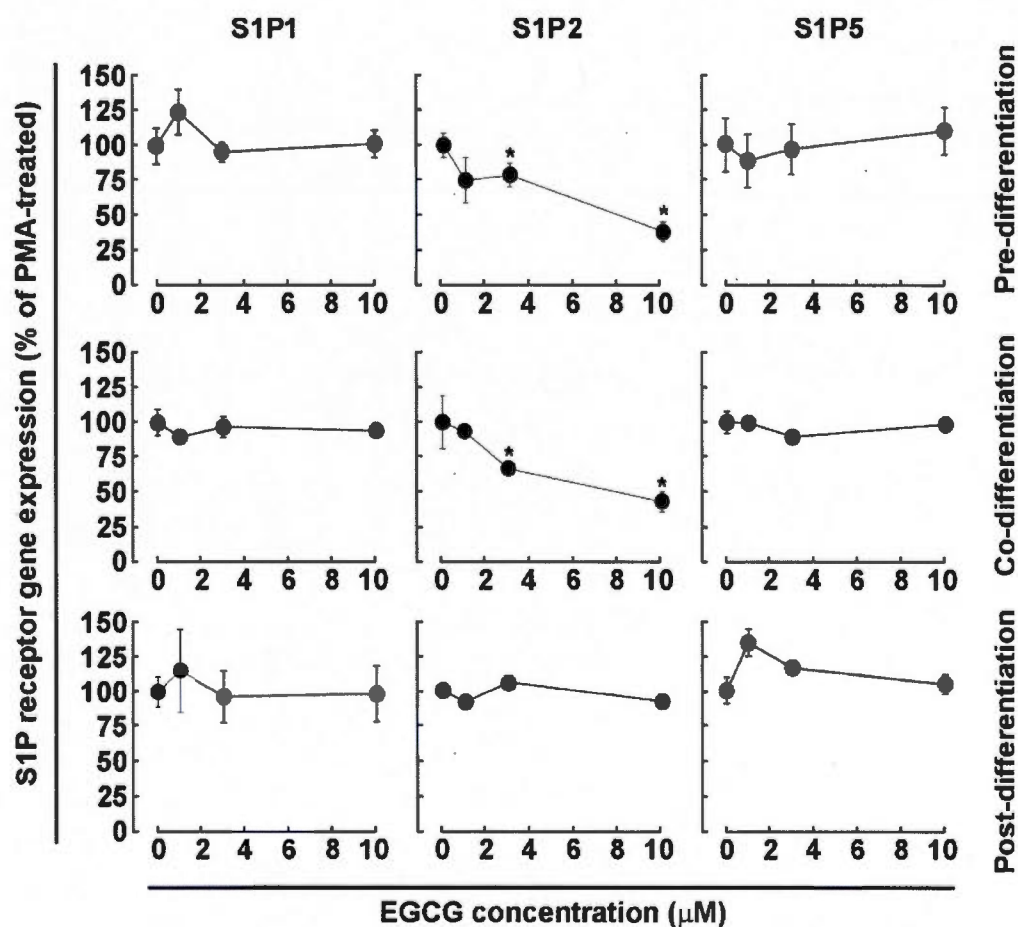


Fig.3.5: EGCG selectively alters S1P receptor gene expression in macrophage-differentiated HL-60 cells. Three different conditions (pre-differentiation, co-differentiation, and post-differentiation as described in Fig.4) were used to evaluate EGCG impact on S1P1, S1P2, and S1P5 gene expression. In all three conditions, total RNA was extracted from adherent cells, and qRT-PCR performed as described in the Methods section.

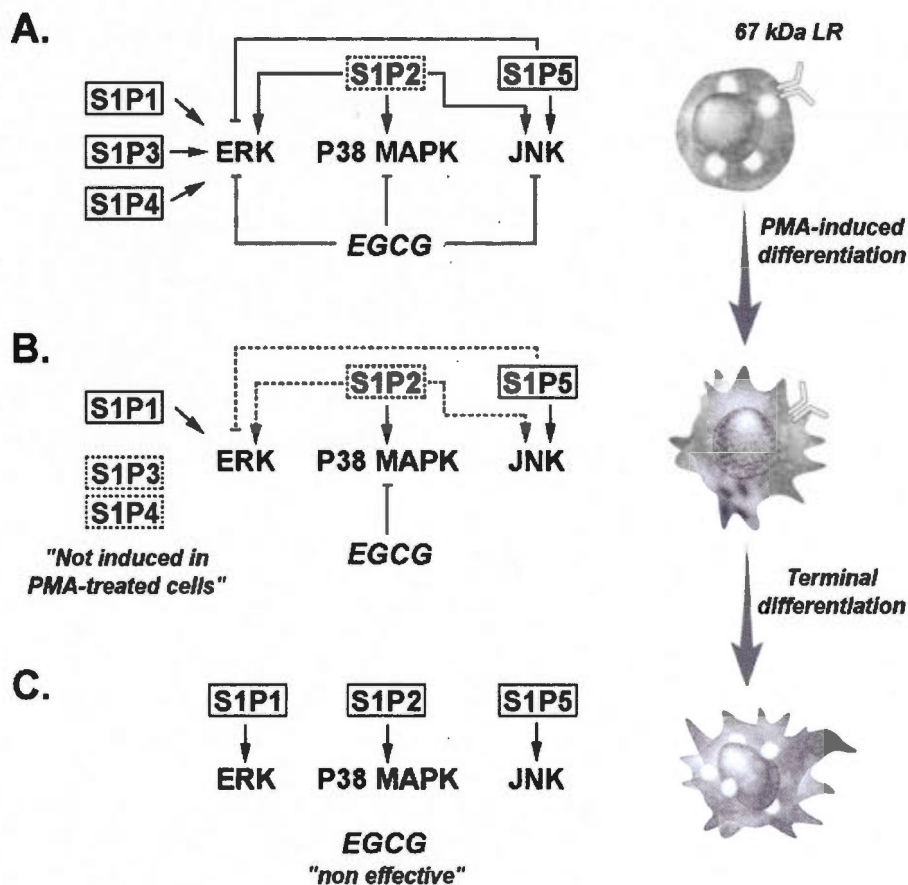


Fig.3.6: Schematic representation of pre-treatment, co-treatment, or post-differentiation cell treatments with EGCG on S1P-mediated signalling pathways. (A) Undifferentiated HL60 cells express the putative EGCG receptor 67 kDa Laminin Receptor (LR) as well as all five S1P receptors. S1P triggers phosphorylation of ERK, P38 MAPK, and JNK. When cells are pre-treated with EGCG, S1P-mediated signalling is abrogated, and S1P2 gene expression inhibited. (B) Differentiation into adherent macrophages is induced with PMA, and only S1P1, S1P2, and S1P5 gene expression are increased. When EGCG is added simultaneously with PMA-induced cell differentiation, S1P2 gene expression is inhibited and only S1P-mediated P38 MAPK phosphorylation is abrogated. (C) Once terminal differentiation is achieved, EGCG is ineffective at inhibiting S1P receptor expression or S1P-mediated signalling, partly because the 67LR is no longer expressed (18).

CHAPITRE IV

DISCUSSION

L'inflammation, ou réaction inflammatoire, est souvent associée à la réponse immunitaire des tissus vivants vascularisés à une agression physique (Coupure, brûlure, infection...), et se manifeste par l'apparition de rougeur, d'une sensation de chaleur, de douleur et d'un œdème. De nombreuses études supportent également la contribution de l'inflammation au phénotype invasif tumoral (Balkwill et Mantovani, 2001). Plus de 25 % des cancers ont été associés à une infection ou à d'autres types d'inflammation chronique (Schetter, Heegaard et Harris, 2010). Une production massive de cytokines et de chimiokines inflammatoires, ainsi que l'augmentation de COX-2 et de NF- κ B contribuent au développement du cancer par le biais de l'inflammation (Schetter, Heegaard et Harris, 2010). Des études suggèrent que la S1P soit une chimiokine qui, à une concentration de 1 nM puisse induire la chimiotaxie des cellules monocytaires et macrophagiques (Gude et al., 2008). De nombreuses pathologies neuro-inflammatoires du SNC s'accompagnent souvent de la rupture de la BHE et amenuise le maintien de l'homéostasie du cerveau. La neuro-inflammation s'accompagne alors d'une infiltration massive des cellules immunitaires. L'influence et les interactions des facteurs inflammatoires sécrétés par les cellules immunitaires, incluant les cytokines, les chimiokines, et les eicosanoïdes, sur l'altération des fonctions cérébrales sont peu connues. Dans notre étude, nous montrons que la S1P, peut également être un acteur majeur dans la régulation des fonctions des cellules HL-60, et cela selon leur stade de différenciation.

L'inhibition de l'inflammation semble être une stratégie efficace pour contrer ou ralentir la progression tumorale (Cabodi et Taverna, 2010). Ainsi, une bonne régulation de la réponse inflammatoire peut être envisagée dans une approche antitumorale (Schetter, Heegaard et Harris, 2010 ; Thun, Henley et Patrono, 2002). Afin de bloquer la progression du cancer ainsi que l'inflammation, l'utilisation de substances anti-inflammatoires et antioxydantes présentes dans notre alimentation peut s'avérer efficace (Gupta *et al.*, 2010).

L'épigallocatechine gallate (EGCG) est une des molécules nutraceutiques reconnues pour ses propriétés anticancéreuses (Pan *et al.*, 2011) (figure 4.1).

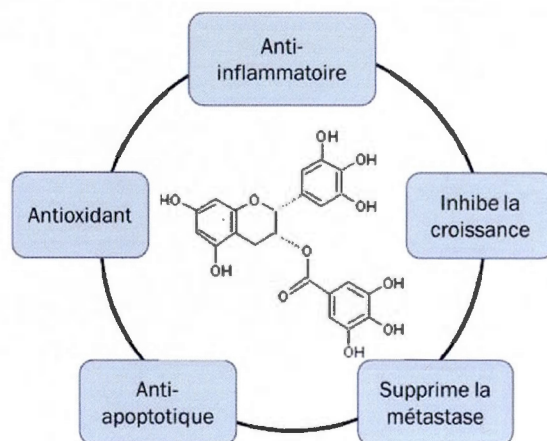


Figure 4.1. Les effets anticancéreux de l'EGCG.

L'EGCG exerce plusieurs effets pour diminuer le risque de développement du cancer, incluant des propriétés anti-inflammatoires, antioxydantes, l'inhibition de la croissance, et la suppression de la métastase.

Les cellules HL-60 sont des cellules promyélomonocytaires. Elles se différencient en d'autres types cellulaires sous l'action d'agents chimiques spécifiques. L'utilisation du PMA, un promoteur de tumeur et activateur de la protéine kinase C, induit la différenciation de ces cellules en « macrophages-like » (Huberman et Callahan, 1979). Les cellules différenciées adhèrent alors au flacon de culture et perdent leur capacité à proliférer (Collins, 1987) (figure 3.1). Nous avons observé que l'induction de la différenciation des cellules HL-60 en macrophages par le PMA entraîne l'augmentation de la sécrétion de MMP-9 (figure 3.1C). La MMP-9 est une métalloprotéinase sécrétée par les cellules qui contribue à la dégradation, et au remodelage de la MEC (Annabi *et al.*, 2007 ; Vezina, Chokor et Annabi, 2012). Son rôle est associé au caractère invasif tumoral, à la formation des métastases et aux maladies inflammatoires (Baay *et al.*, 2011 ; McMillan *et al.*, 1996).

La S1P est synthétisée et sécrétée par plusieurs types cellulaires incluant les monocytes, les cellules endothéliales et les glioblastomes où la SPHK -un biomarqueur oncogénique- est fortement exprimé. Ces effets sont médiés par une famille des récepteurs couplée aux protéines G les récepteurs à la S1P (S1P1-S1P5). Nous avons évalué l'expression génique de ces récepteurs dans les cellules différenciées par le PMA, et exprimant un phénotype « macrophages-like ». Nous avons observé que les récepteurs S1P1, S1P2 et S1P5 sont fortement induits, avec une induction marginale de S1P3 et S1P4 (figure 3.2B) suggérant que les macrophages pourraient être sensibles à la S1P. La S1P agit par l'intermédiaire des mécanismes autocrines et/ou paracrines. Nous avons démontré que dans les macrophages, la S1P déclenche des cascades de phosphorylation d'ERK1/2, de JNK et de P-38 MAPK (figure 3.3B), en accord avec d'autres études (Taha, Argraves et Obeid, 2004). Effectivement, ces voies de signalisation ont un rôle bien documenté dans la régulation de la prolifération, de la migration ainsi que dans la survie cellulaire. Des études ont montré que ces trois cascades peuvent être activées par plusieurs facteurs y compris les facteurs de croissance, les cytokines et les récepteurs couplés aux protéines G (Chen *et al.*, 2001) .

L'EGCG, un polyphénol prédominant retrouvé dans le thé vert, est un des phytoéléments chimiopréventifs les plus étudiés (Khan *et al.*, 2006). Il a été montré que l'EGCG peut moduler les voies de transduction de signaux impliqués dans la prolifération, la transformation, l'inflammation, l'apoptose, la métastase et l'invasion cellulaire, bloquant ainsi plusieurs étapes de la cancérogenèse (Na et Surh, 2006). Nous avons étudié la capacité potentielle de l'EGCG à affecter la réponse cellulaire à la S1P. Pour atteindre ce but, nous avons évalué l'effet de l'EGCG soit en pré-différenciation (i.e. avant le traitement des cellules HL-60 par le PMA pour les différencier en macrophages), soit en co-différenciation (i.e. traitement des cellules HL-60 par l'EGCG simultanément avec le PMA), soit en post-différenciation, (i.e. traitement avec l'EGCG des cellules macrophages déjà différenciées). Nous avons observé que l'EGCG inhibe de 80 à 90% les trois voies MAPKs dans les cellules pré-différenciées, et de 50% la voie P-38 MAPK dans les cellules co-différenciées. À l'inverse, l'EGCG était incapable d'inhiber les voies MAPK médiées par la S1P dans la condition de post-différenciation (figure 3.4). De plus, nous avons démontré que l'EGCG ne régule à la baisse que l'expression du récepteur S1P2 dans les conditions de pré- et de co-

différenciation (figure 3.5). Ainsi, l'inhibition des voies de signalisation ERK1/2, JNK, P-38 MAPK en pré-différenciation pourrait s'expliquer par l'inhibition du récepteur S1P2. Il a été démontré que le récepteur S1P2 active ERK1/2, via le sous-unité $G_{i\beta\gamma}$ ainsi que JNK et P-38 MAPK (Taha, Argraves et Obeid, 2004) et ceci corrèle avec notre étude. Lors de la différenciation, l'EGCG a été incapable d'inhiber la phosphorylation d'ERK1/2 et de JNK médiée par la S1P ce qui suggère que ces deux voies puissent être activées par des récepteurs à la S1P qui ne sont pas sensibles à l'action de l'EGCG, plus spécifiquement dans notre étude les récepteurs S1P1 et S1P5. Les fonctions médiées par le S1P2 restent controversées. En effet, une étude a montré que le S1P2 régule négativement le recrutement des macrophages vers le site inflammatoire (Michaud, Im et Hla, 2010), alors qu'une autre a démontré qu'il potentialise également le chimiotactisme des fibroblastes de poumon humains (Hashimoto *et al.*, 2008). Dans la condition post-différenciation, les macrophages différenciés sont devenus insensibles à l'action de l'EGCG à inhiber les voies MAPKs (figure 3.6C). Cette inefficacité de l'EGCG pourrait être expliquée par la régulation à la baisse de l'expression du récepteur à laminine de 67 KDa (67LR) (Vezina, Chokor et Annabi, 2012). Le 67LR est le récepteur non-intégrine de l'EGCG (Tachibana, 2009). Il a été démontré que dans les « macrophages-like », l'expression du récepteur à laminine 67LR est fortement diminuée et que celle de son précurseur de 37 KDa (Givant-Horwitz, Davidson et Reich, 2005) est abolie en comparaison aux cellules HL-60 traitées au PMA, mais non différenciées en « macrophages-like » (Vezina, Chokor et Annabi, 2012). L'élimination du 37LR dans les cellules différenciées peut expliquer la diminution de l'expression du 67LR. En conséquence, l'activation de la voie 67LR est affaiblie justifiant l'absence d'inhibition par l'EGCG des voies MAPK dans les « macrophages-like ». À la lumière de nos résultats, il est toutefois tentant de suggérer que l'impact efficace de l'EGCG ne puisse être atteint que dans un contexte chimiopréventif où la chimiotaxie médiée par les facteurs de croissance dérivés d'une tumeur, comme celle qui peut être déclenchée par la S1P, pourrait être abrogée.

La S1P est également essentielle pour le trafic des cellules immunitaires plus spécifiquement les macrophages (Rivera, Proia et Olivera, 2008). In vivo, des études ont démontré qu'un médicament immunosuppresseur FTY720 dont la structure est analogue à celle de la S1P réduit l'infiltration des macrophages aux nerfs périphériques dans un modèle

de névrite auto-immune expérimentale (EAN) (Zhang *et al.*, 2008), et vers le SNC dans un modèle d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) (Fujino *et al.*, 2003). La signalisation de la S1P dans les macrophages joue plusieurs rôles. La S1P inhibe la production des cytokines pro-inflammatoires ainsi que l'activation de NF- κ B, tout en élevant l'expression de médiateurs pro-angiogéniques et anti-inflammatoires. Elle inhibe également la mort cellulaire des macrophages et induit l'expression de cox-2 pour élever la production des AMPc (Weigert, Weis et Brune, 2009). Dans notre modèle cellulaire, la S1P a été rapportée ne pas induire la mort cellulaire des macrophages (Weigert, Weis et Brune, 2009). Nous avons aussi démontré un rôle chimiopréventif de l'EGCG permettant d'inhiber des voies de signalisation MAPK impliquées dans la prolifération et la migration des cellules immunitaires induites par la S1P. L'inhibition des processus inflammatoires reliés à l'état de différenciation des cellules immunitaires circulantes et des cellules tumorales est importante. Les macrophages dérivés des cellules HL-60 peuvent migrer au travers de la BHE conduisant à la neuroinflammation (Seidel *et al.*, 2011). De ce fait, l'inhibition des biomarqueurs cibles, dans ce cas, les voies de signalisation est essentielle à la prévention des maladies cérébrales difficiles à traiter.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La compréhension du rôle des facteurs pro-inflammatoires, tels les cytokines et les chimiokines libérés par les cellules immunitaires, dans le contrôle et l'altération des fonctions cérébrales constitue un grand défi des recherches cliniques et fondamentales. La S1P est considérée comme une chimiokine jouant un rôle crucial dans l'invasion et la métastase ainsi que dans les maladies neuroinflammatoires. Par conséquent, il est impératif d'identifier des agents thérapeutiques qui pourront inhiber la transduction du signal induite par ce facteur afin de prévenir ou de diminuer la progression des maladies notamment le cancer. Dans notre étude, nous avons choisi l'EGCG comme agent nutraceutique à cause de son rôle important documenté au niveau de la prévention du cancer en agissant sur les mécanismes impliqués dans la progression tumorale. Nous avons démontré ces effets bénéfiques dans l'inhibition des voies de signalisation MAPK impliquées dans l'inflammation, la prolifération, l'apoptose et la différenciation induites par la S1P dans les cellules HL-60 différenciées par le PMA et en condition de pré-différenciation. Dans cette condition, l'EGCG agit en inhibant l'expression du récepteur S1P2. Des études ont montré que l'EGCG requiert la présence de son récepteur 67LR pour être effectif. Nous avons démontré que l'EGCG, dans les macrophages en condition post-différenciation, est inefficace et que cela pourrait être expliqué par la très faible expression de 67LR dans les cellules différenciées en « macrophages-like » par rapport aux cellules traitées au PMA. Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'expression du récepteur à l'EGCG lors de la différenciation cellulaire des cellules HL-60 et de confirmer son importance en utilisant des siRNA bloquant son expression.

Les facteurs de croissance étant également impliqués dans les processus cancéreux favorisant l'angiogenèse et d'autres mécanismes, ils pourraient constituer des cibles thérapeutiques de traitements anticancéreux utilisant des antagonistes des récepteurs ou des inhibiteurs qui bloquent leurs actions. De ce fait, nous avons initié une étude préliminaire de la modulation dans l'expression de ces facteurs lors de la différenciation cellulaire des HL-60. Nous avons observé que le PMA induit fortement l'expression du facteur de croissance plaquettaire (PDGF) et du facteur de croissance fibroblastique (FGF) dans les cellules

« macrophages-like » (figure 4.2). Il serait donc envisageable d'étudier si l'EGCG joue un rôle inhibiteur dans l'expression de ces deux facteurs et s'il module la transduction des signaux cellulaires induite par ces facteurs. La BHE régule le passage des agents pathogènes et cellules circulantes du sang vers le cerveau. De plus, elle empêche l'acheminement de certains médicaments anti-inflammatoires au sein du cerveau rendant certains traitements thérapeutiques peu efficaces. D'où le but ultime de notre étude dans la prévention ou la diminution de la neuroinflammation associée au développement tumoral et à la perturbation de la BHE en utilisant des agents dérivés de notre alimentation.

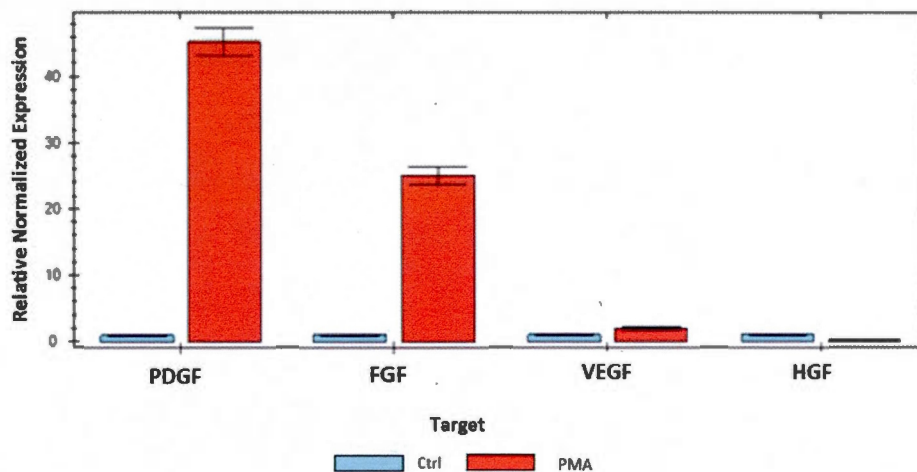


Figure 4.2. La différenciation des cellules HL-60 en macrophages par le PMA induit fortement l'expression de PDGF et FGF

Les cellules HL-60 ont été traitées pendant 24 heures par le PMA pour induire la différenciation. Ensuite l'ARN total a été isolé des cellules adhérentes différenciées et transcrit en cDNA. L'expression génique des facteurs de croissance a été évaluée par qRT-PCR.

RÉFÉRENCES

1913. «The Late Professor Edwin Goldmann's Investigations on the Central Nervous System by Vital Staining». *Br Med J*, vol. 2, no 2753, p. 871-873.
- Almeida, Craig A., et Sheila A. Barry. 2010. *Cancer: Basic Science and Clinical Aspects*: Wiley-Blackwell, 424 p.
- Aloisi, F. 2001. «Immune function of microglia». *Glia*, vol. 36, no 2, p. 165-179.
- An, S., Y. Zheng et T. Bleu. 2000. «Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors Edg3 and Edg5». *J Biol Chem*, vol. 275, no 1, p. 288-296.
- Anand, P., A. B. Kunnumakkara, C. Sundaram, K. B. Harikumar, S. T. Tharakan, O. S. Lai, B. Sung et B. B. Aggarwal. 2008. «Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes». *Pharm Res*, vol. 25, no 9, p. 2097-2116.
- Ancellin, N., et T. Hla. 1999. «Differential pharmacological properties and signal transduction of the sphingosine 1-phosphate receptors EDG-1, EDG-3, and EDG-5». *J Biol Chem*, vol. 274, no 27, p. 18997-19002.
- Annabi, B., J. C. Currie, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2007. «Inhibition of HuR and MMP-9 expression in macrophage-differentiated HL-60 myeloid leukemia cells by green tea polyphenol EGCg». *Leuk Res*, vol. 31, no 9, p. 1277-1284.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, N. Bousquet-Gagnon, M. Page, D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin 3-gallate inhibits MMP-2 secretion and MT1-MMP-driven migration in glioblastoma cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1542, no 1-3, p. 209-220.
- Annabi, B., M. P. Lachambre, K. Plouffe, H. Sartelet et R. Beliveau. 2009. «Modulation of invasive properties of CD133+ glioblastoma stem cells: a role for MT1-MMP in bioactive lysophospholipid signaling». *Mol Carcinog*, vol. 48, no 10, p. 910-919.
- Annabi, B., Y. T. Lee, S. Turcotte, E. Naud, R. R. Desrosiers, M. Champagne, N. Eliopoulos, J. Galipeau et R. Beliveau. 2003. «Hypoxia promotes murine bone-marrow-derived stromal cell migration and tube formation». *Stem Cells*, vol. 21, no 3, p. 337-347.
- Anses (2012). Étude des liens entre facteurs de croissance, consommation de lait et de produits laitiers et cancers
- Arts, I. C., et P. C. Hollman. 2005. «Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies». *Am J Clin Nutr*, vol. 81, no 1 Suppl, p. 317S-325S.

- Asano, Y., S. Okamura, T. Ogo, T. Eto, T. Otsuka et Y. Niho. 1997. «Effect of (-)-epigallocatechin gallate on leukemic blast cells from patients with acute myeloblastic leukemia». *Life Sci*, vol. 60, no 2, p. 135-142.
- Baay, M., A. Brouwer, P. Pauwels, M. Peeters et F. Lardon. 2011. «Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy». *Clin Dev Immunol*, vol. 2011, p. 565187.
- Balkwill, F., et A. Mantovani. 2001. «Inflammation and cancer: back to Virchow?». *Lancet*, vol. 357, no 9255, p. 539-545.
- Bektas, M., P. S. Jolly, C. Muller, J. Eberle, S. Spiegel et C. C. Geilen. 2005. «Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression». *Oncogene*, vol. 24, no 1, p. 178-187.
- Béliveau, R., et D. Gingras. 2007. «Role of nutrition in preventing cancer». *Can Fam Physician*, vol. 53, no 11, p. 1905-1911.
- Beltran, J. A., J. Peek et S. L. Chang. 2006. «Expression and regulation of the mu opioid peptide receptor in TPA-differentiated HL-60 promyelocytic leukemia cells». *Int Immunopharmacol*, vol. 6, no 8, p. 1331-1340.
- Berdyshev, E. V., I. A. Gorshkova, J. G. Garcia, V. Natarajan et W. C. Hubbard. 2005. «Quantitative analysis of sphingoid base-1-phosphates as bisacetylated derivatives by liquid chromatography-tandem mass spectrometry». *Anal Biochem*, vol. 339, no 1, p. 129-136.
- Blasi, P., S. Giovagnoli, A. Schoubben, M. Ricci et C. Rossi. 2007. «Solid lipid nanoparticles for targeted brain drug delivery». *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 59, no 6, p. 454-477.
- Bocchetta, M., et M. Carbone. 2004. «Epidemiology and molecular pathology at crossroads to establish causation: molecular mechanisms of malignant transformation». *Oncogene*, vol. 23, no 38, p. 6484-6491.
- Bogoyevitch, M. A., et P. G. Arthur. 2008. «Inhibitors of c-Jun N-terminal kinases: JunK no more?». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1784, no 1, p. 76-93.
- Brizuela, L., A. Dayon, N. Doumerc, I. Ader, M. Golzio, J. C. Izard, Y. Hara, B. Malavaud et O. Cuvillier. 2010. «The sphingosine kinase-1 survival pathway is a molecular target for the tumor-suppressive tea and wine polyphenols in prostate cancer». *FASEB J*, vol. 24, no 10, p. 3882-3894.
- Brock, A., S. Huang et D. E. Ingber. 2003. «Identification of a distinct class of cytoskeleton-associated mRNAs using microarray technology». *BMC Cell Biol*, vol. 4, p. 6.

- Burri, P. H., et V. Djonov. 2002. «Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting». *Mol Aspects Med*, vol. 23, no 6S, p. S1-27.
- Burri, P. H., R. Hlushchuk et V. Djonov. 2004. «Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance». *Dev Dyn*, vol. 231, no 3, p. 474-488.
- Butovsky, O., S. Bukshpan, G. Kunis, S. Jung et M. Schwartz. 2007. «Microglia can be induced by IFN-gamma or IL-4 to express neural or dendritic-like markers». *Mol Cell Neurosci*, vol. 35, no 3, p. 490-500.
- Cabodi, S., et D. Taverna. 2010. «Interfering with inflammation: a new strategy to block breast cancer self-renewal and progression?». *Breast Cancer Res*, vol. 12, no 2, p. 305.
- Cai, D. 2013. «Neuroinflammation and neurodegeneration in overnutrition-induced diseases». *Trends Endocrinol Metab*, vol. 24, no 1, p. 40-47.
- Capucine Baldini, Boris Duchemann, Antoine Hollebecque, Émilie Routier, Andreea Varga, Anas Gazzah, Rastio Bahleda, Benjamin Besse, Jean-Charles Soria, Christophe Massard. 2012. «Focus on targeting the Ras-MAPK pathway: the Mek inhibitors». *Bull Cancer*, vol. 99.
- Carman, C. V. 2009. «Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'». *J Cell Sci*, vol. 122, no Pt 17, p. 3025-3035.
- Carmeliet, P. 2005. «Angiogenesis in life, disease and medicine». *Nature*, vol. 438, no 7070, p. 932-936.
- Carson, M. J., J. M. Doose, B. Melchior, C. D. Schmid et C. C. Ploix. 2006. «CNS immune privilege: hiding in plain sight». *Immunol Rev*, vol. 213, p. 48-65.
- Chang, L., et M. Karin. 2001. «Mammalian MAP kinase signalling cascades». *Nature*, vol. 410, no 6824, p. 37-40.
- Chavarria, A., et J. Alcocer-Varela. 2004. «Is damage in central nervous system due to inflammation?». *Autoimmun Rev*, vol. 3, no 4, p. 251-260.
- Chen, A., et L. Zhang. 2003. «The antioxidant (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits rat hepatic stellate cell proliferation in vitro by blocking the tyrosine phosphorylation and reducing the gene expression of platelet-derived growth factor-beta receptor». *J Biol Chem*, vol. 278, no 26, p. 23381-23389.
- Chen, W., Z. Li, L. Bai et Y. Lin. 2011. «NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target». *Front Biosci*, vol. 16, p. 1172-1185.

- Chen, Z., T. B. Gibson, F. Robinson, L. Silvestro, G. Pearson, B. Xu, A. Wright, C. Vanderbilt et M. H. Cobb. 2001. «MAP kinases». *Chem Rev*, vol. 101, no 8, p. 2449-2476.
- Chun, J., E. J. Goetzl, T. Hla, Y. Igarashi, K. R. Lynch, W. Moolenaar, S. Pyne et G. Tigyi. 2002. «International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature». *Pharmacol Rev*, vol. 54, no 2, p. 265-269.
- Cierniewski, C. S., M. Malinowski, R. Bednarek et A. Cierniewska-Cieslak. 2007. «Adhesive and proteolytic phenotype of migrating endothelial cells induced by thymosin beta-4». *Ann NY Acad Sci*, vol. 1112, p. 123-139.
- Collins, S. J. 1987. «The HL-60 promyelocytic leukemia cell line: proliferation, differentiation, and cellular oncogene expression». *Blood*, vol. 70, no 5, p. 1233-1244.
- Cooper, R., D. J. Morre et D. M. Morre. 2005. «Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits». *J Altern Complement Med*, vol. 11, no 3, p. 521-528.
- Cristofanilli, M., C. Charnsangavej et G. N. Hortobagyi. 2002. «Angiogenesis modulation in cancer research: novel clinical approaches». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 1, no 6, p. 415-426.
- Dalla-Favera, R., F. Wong-Staal et R. C. Gallo. 1982. «Onc gene amplification in promyelocytic leukaemia cell line HL-60 and primary leukaemic cells of the same patient». *Nature*, vol. 299, no 5878, p. 61-63.
- Davis, R. J. 2000. «Signal transduction by the JNK group of MAP kinases». *Cell*, vol. 103, no 2, p. 239-252.
- de Vries, H. E., G. Kooij, D. Frenkel, S. Georgopoulos, A. Monsonogo et D. Janigro. 2012. «Inflammatory events at blood-brain barrier in neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: implications for clinical disease». *Epilepsia*, vol. 53 Suppl 6, p. 45-52.
- Demeule, M., A. Regina, J. Jodoin, A. Laplante, C. Dagenais, F. Berthelet, A. Moghrabi et R. Beliveau. 2002. «Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier». *Vascul Pharmacol*, vol. 38, no 6, p. 339-348.
- Di Domenico, F., C. Foppoli, R. Coccia et M. Perluigi. 2012. «Antioxidants in cervical cancer: chemopreventive and chemotherapeutic effects of polyphenols». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1822, no 5, p. 737-747.

- Edsall, L. C., et S. Spiegel. 1999. «Enzymatic measurement of sphingosine 1-phosphate». *Anal Biochem*, vol. 272, no 1, p. 80-86.
- Ehrlrich, Paul. 1885. «Das Sauerstoff-Bedürfnis des Organismus. Eine farbenanalytische Studie.». Herschwald, Berlin.
- Engelhardt, B., et R. M. Ransohoff. 2005. «The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms». *Trends Immunol*, vol. 26, no 9, p. 485-495.
- Feng, S., J. Cen, Y. Huang, H. Shen, L. Yao, Y. Wang et Z. Chen. 2011a. «Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins». *PLoS One*, vol. 6, no 8, p. e20599.
- Feng, S. R., Z. X. Chen, J. N. Cen, H. J. Shen, Y. Y. Wang et L. Yao. 2011b. «[Disruption of blood brain-barrier by leukemic cells in central nervous system leukemia]». *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi*, vol. 32, no 5, p. 289-293.
- Ferrara, N., et T. Davis-Smyth. 1997. «The biology of vascular endothelial growth factor». *Endocr Rev*, vol. 18, no 1, p. 4-25.
- Fetler, L., et S. Amigorena. 2005. «Neuroscience. Brain under surveillance: the microglia patrol». *Science*, vol. 309, no 5733, p. 392-393.
- Folkman, J. 1996. «Endogenous inhibitors of angiogenesis». *Harvey Lect*, vol. 92, p. 65-82.
- , 2004. «Endogenous angiogenesis inhibitors». *APMIS*, vol. 112, no 7-8, p. 496-507.
- Fujino, M., N. Funeshima, Y. Kitazawa, H. Kimura, H. Amemiya, S. Suzuki et X. K. Li. 2003. «Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats by FTY720 treatment». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 305, no 1, p. 70-77.
- Galvao, R. P., et H. Zong. 2013. «Inflammation and Gliomagenesis: Bi-Directional Communication at Early and Late Stages of Tumor Progression». *Curr Pathobiol Rep*, vol. 1, no 1, p. 19-28.
- Gingras, D., M. Michaud, G. Di Tomasso, E. Beliveau, C. Nyalendo et R. Beliveau. 2008. «Sphingosine-1-phosphate induces the association of membrane-type 1 matrix metalloproteinase with p130Cas in endothelial cells». *FEBS Lett*, vol. 582, no 3, p. 399-404.
- Givant-Horwitz, V., B. Davidson et R. Reich. 2005. «Laminin-induced signaling in tumor cells». *Cancer Lett*, vol. 223, no 1, p. 1-10.

- Goh, P. P., D. M. Sze et B. D. Roufogalis. 2007. «Molecular and cellular regulators of cancer angiogenesis». *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 7, no 8, p. 743-758.
- Gonzalo, P., et A. G. Arroyo. 2010. «MT1-MMP: A novel component of the macrophage cell fusion machinery». *Commun Integr Biol*, vol. 3, no 3, p. 256-259.
- Gude, D. R., S. E. Alvarez, S. W. Paugh, P. Mitra, J. Yu, R. Griffiths, S. E. Barbour, S. Milstien et S. Spiegel. 2008. «Apoptosis induces expression of sphingosine kinase 1 to release sphingosine-1-phosphate as a "come-and-get-me" signal». *FASEB J*, vol. 22, no 8, p. 2629-2638.
- Gupta, S. C., J. H. Kim, S. Prasad et B. B. Aggarwal. 2010. «Regulation of survival, proliferation, invasion, angiogenesis, and metastasis of tumor cells through modulation of inflammatory pathways by nutraceuticals». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 29, no 3, p. 405-434.
- Hailer, N. P. 2008. «Immunosuppression after traumatic or ischemic CNS damage: it is neuroprotective and illuminates the role of microglial cells». *Prog Neurobiol*, vol. 84, no 3, p. 211-233.
- Han, J., J. D. Lee, L. Bibbs et R. J. Ulevitch. 1994. «A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells». *Science*, vol. 265, no 5173, p. 808-811.
- Hanahan, D., et R. A. Weinberg. 2011. «Hallmarks of cancer: the next generation». *Cell*, vol. 144, no 5, p. 646-674.
- Hanks, S. K., et T. Hunter. 1995. «Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification». *FASEB J*, vol. 9, no 8, p. 576-596.
- Hart, B. A., et W. F. den Dunnen. 2013. «Commentary on Special Issue: CNS Diseases and the Immune System». *J Neuroimmune Pharmacol*.
- Hashimoto, M., X. Wang, L. Mao, T. Kobayashi, S. Kawasaki, N. Mori, M. L. Toews, H. J. Kim, D. R. Ceruti, X. Liu et S. I. Rennard. 2008. «Sphingosine 1-phosphate potentiates human lung fibroblast chemotaxis through the S1P2 receptor». *Am J Respir Cell Mol Biol*, vol. 39, no 3, p. 356-363.
- Heldin, C. H. 1995. «Dimerization of cell surface receptors in signal transduction». *Cell*, vol. 80, no 2, p. 213-223.
- Hibasami, H., T. Komiya, Y. Achiwa, K. Ohnishi, T. Kojima, K. Nakanishi, K. Akashi et Y. Hara. 1998. «Induction of apoptosis in human stomach cancer cells by green tea catechins». *Oncol Rep*, vol. 5, no 2, p. 527-529.

- Hickey, W. F., et H. Kimura. 1988. «Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo». *Science*, vol. 239, no 4837, p. 290-292.
- Hillen, F., et A. W. Griffioen. 2007. «Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond». *Cancer Metastasis Rev*, vol. 26, no 3-4, p. 489-502.
- Hla, T., M. J. Lee, N. Ancellin, S. Thangada, C. H. Liu, M. Kluk, S. S. Chae et M. T. Wu. 2000. «Sphingosine-1-phosphate signaling via the EDG-1 family of G-protein-coupled receptors». *Ann N Y Acad Sci*, vol. 905, p. 16-24.
- Hoelzinger, D. B., T. Demuth et M. E. Berens. 2007. «Autocrine factors that sustain glioma invasion and paracrine biology in the brain microenvironment». *J Natl Cancer Inst*, vol. 99, no 21, p. 1583-1593.
- Huberman, E., et M. F. Callahan. 1979. «Induction of terminal differentiation in human promyelocytic leukemia cells by tumor-promoting agents». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 76, no 3, p. 1293-1297.
- Hubert, Pierre. 2006. «Growth factors of the EGF family and their receptors». *Bull Cancer*, p. 17-24.
- Hurley, L. L., et Y. Tizabi. 2013. «Neuroinflammation, neurodegeneration, and depression». *Neurotox Res*, vol. 23, no 2, p. 131-144.
- Ishii, I., B. Friedman, X. Ye, S. Kawamura, C. McGiffert, J. J. Contos, M. A. Kingsbury, G. Zhang, J. H. Brown et J. Chun. 2001. «Selective loss of sphingosine 1-phosphate signaling with no obvious phenotypic abnormality in mice lacking its G protein-coupled receptor, LP(B3)/EDG-3». *J Biol Chem*, vol. 276, no 36, p. 33697-33704.
- Jain, R. K. 2002. «Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor». *Semin Oncol*, vol. 29, no 6 Suppl 16, p. 3-9.
- Jankun, J., S. H. Selman, R. Swiercz et E. Skrzypczak-Jankun. 1997. «Why drinking green tea could prevent cancer». *Nature*, vol. 387, no 6633, p. 561.
- Jiang, Y., C. Chen, Z. Li, W. Guo, J. A. Gegner, S. Lin et J. Han. 1996. «Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)». *J Biol Chem*, vol. 271, no 30, p. 17920-17926.
- Kawamori, T., W. Osta, K. R. Johnson, B. J. Pettus, J. Bielawski, T. Tanaka, M. J. Wargovich, B. S. Reddy, Y. A. Hannun, L. M. Obeid et D. Zhou. 2006. «Sphingosine kinase 1 is up-regulated in colon carcinogenesis». *FASEB J*, vol. 20, no 2, p. 386-388.

- Khan, N., F. Afaq, M. Saleem, N. Ahmad et H. Mukhtar. 2006. «Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate». *Cancer Res*, vol. 66, no 5, p. 2500-2505.
- King, J. G., Jr., et K. Khalili. 2001. «Inhibition of human brain tumor cell growth by the anti-inflammatory drug, flurbiprofen». *Oncogene*, vol. 20, no 47, p. 6864-6870.
- Kluk, M. J., et T. Hla. 2002. «Signaling of sphingosine-1-phosphate via the S1P/EDG-family of G-protein-coupled receptors». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1582, no 1-3, p. 72-80.
- Kubes, P., et P. A. Ward. 2000. «Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response». *Brain Pathol*, vol. 10, no 1, p. 127-135.
- Kumar, S., J. Boehm et J. C. Lee. 2003. «p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases». *Nat Rev Drug Discov*, vol. 2, no 9, p. 717-726.
- Kyriakis, J. M., et J. Avruch. 2001. «Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation». *Physiol Rev*, vol. 81, no 2, p. 807-869.
- Lakhan, S. E., A. Kirchgessner, D. Tepper et A. Leonard. 2013. «Matrix metalloproteinases and blood-brain barrier disruption in acute ischemic stroke». *Front Neurol*, vol. 4, p. 32.
- Lamy, S., D. Gingras et R. Beliveau. 2002. «Green tea catechins inhibit vascular endothelial growth factor receptor phosphorylation». *Cancer Res*, vol. 62, no 2, p. 381-385.
- Lee, J. C., J. T. Laydon, P. C. McDonnell, T. F. Gallagher, S. Kumar, D. Green, D. McNulty, M. J. Blumenthal, J. R. Heys, S. W. Landvatter et al. 1994. «A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis». *Nature*, vol. 372, no 6508, p. 739-746.
- Lee, M. J., M. Evans et T. Hla. 1996. «The inducible G protein-coupled receptor edg-1 signals via the G(i)/mitogen-activated protein kinase pathway». *J Biol Chem*, vol. 271, no 19, p. 11272-11279.
- Lee, M. J., S. Thangada, K. P. Claffey, N. Ancellin, C. H. Liu, M. Kluk, M. Volpi, R. I. Sha'afi et T. Hla. 1999a. «Vascular endothelial cell adherens junction assembly and morphogenesis induced by sphingosine-1-phosphate». *Cell*, vol. 99, no 3, p. 301-312.
- Lee, O. H., Y. M. Kim, Y. M. Lee, E. J. Moon, D. J. Lee, J. H. Kim, K. W. Kim et Y. G. Kwon. 1999b. «Sphingosine 1-phosphate induces angiogenesis: its angiogenic action and signaling mechanism in human umbilical vein endothelial cells». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 264, no 3, p. 743-750.

- Liu, B., et J. S. Hong. 2003. «Role of microglia in inflammation-mediated neurodegenerative diseases: mechanisms and strategies for therapeutic intervention». *J Pharmacol Exp Ther*, vol. 304, no 1, p. 1-7.
- Liu, X., D. Y. Zhang, W. Zhang, X. Zhao, C. Yuan et F. Ye. 2011. «The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma». *Nutr Cancer*, vol. 63, no 3, p. 466-475.
- Luqman, S., et J. M. Pezzuto. 2010. «NFkappaB: a promising target for natural products in cancer chemoprevention». *Phytother Res*, vol. 24, no 7, p. 949-963.
- Madhusudan, S., et A. L. Harris. 2002. «Drug inhibition of angiogenesis». *Curr Opin Pharmacol*, vol. 2, no 4, p. 403-414.
- Man, S., E. E. Ubogu et R. M. Ransohoff. 2007. «Inflammatory cell migration into the central nervous system: a few new twists on an old tale». *Brain Pathol*, vol. 17, no 2, p. 243-250.
- Manach, C., A. Scalbert, C. Morand, C. Remesy et L. Jimenez. 2004. «Polyphenols: food sources and bioavailability». *Am J Clin Nutr*, vol. 79, no 5, p. 727-747.
- Mantovani, A., B. Savino, M. Locati, L. Zammataro, P. Allavena et R. Bonecchi. 2010. «The chemokine system in cancer biology and therapy». *Cytokine Growth Factor Rev*, vol. 21, no 1, p. 27-39.
- Marchesini, N., et Y. A. Hannun. 2004. «Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation». *Biochem Cell Biol*, vol. 82, no 1, p. 27-44.
- McMillan, J. I., R. Weeks, J. W. West, S. Bursten, G. C. Rice et D. H. Lovett. 1996. «Pharmacological inhibition of gelatinase B induction and tumor cell invasion». *Int J Cancer*, vol. 67, no 4, p. 523-531.
- McVerry, B. J., et J. G. Garcia. 2004. «Endothelial cell barrier regulation by sphingosine 1-phosphate». *J Cell Biochem*, vol. 92, no 6, p. 1075-1085.
- Medawar, P. B. 1948. «Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye». *Br J Exp Pathol*, vol. 29, no 1, p. 58-69.
- Mehta, R. 1995. «The potential for the use of cell proliferation and oncogene expression as intermediate markers during liver carcinogenesis». *Cancer Lett*, vol. 93, no 1, p. 85-102.

- Meister, M., A. Tomasovic, A. Banning et R. Tikkanen. 2013. «Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Scaffolding Proteins: A Recount». *Int J Mol Sci*, vol. 14, no 3, p. 4854-4884.
- Michaud, J., D. S. Im et T. Hla. 2010. «Inhibitory role of sphingosine 1-phosphate receptor 2 in macrophage recruitment during inflammation». *J Immunol*, vol. 184, no 3, p. 1475-1483.
- Mignatti, P., et D. B. Rifkin. 1996. «Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis». *Enzyme Protein*, vol. 49, no 1-3, p. 117-137.
- Miller, D. W. 1999. «Immunobiology of the blood-brain barrier». *J Neurovirol*, vol. 5, no 6, p. 570-578.
- Murdoch, C., M. Muthana, S. B. Coffelt et C. E. Lewis. 2008. «The role of myeloid cells in the promotion of tumour angiogenesis». *Nat Rev Cancer*, vol. 8, no 8, p. 618-631.
- Na, H. K., et Y. J. Surh. 2006. «Intracellular signaling network as a prime chemopreventive target of (-)-epigallocatechin gallate». *Mol Nutr Food Res*, vol. 50, no 2, p. 152-159.
- Nakajima, M., D. Lotan, M. M. Baig, R. M. Carralero, W. R. Wood, M. J. Hendrix et R. Lotan. 1989. «Inhibition by retinoic acid of type IV collagenolysis and invasion through reconstituted basement membrane by metastatic rat mammary adenocarcinoma cells». *Cancer Res*, vol. 49, no 7, p. 1698-1706.
- Nguyen, M. D., T. D'Aigle, G. Gowing, J. P. Julien et S. Rivest. 2004. «Exacerbation of motor neuron disease by chronic stimulation of innate immunity in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis». *J Neurosci*, vol. 24, no 6, p. 1340-1349.
- Novgorodov, A. S., M. El-Alwani, J. Bielawski, L. M. Obeid et T. I. Gudz. 2007. «Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration». *FASEB J*, vol. 21, no 7, p. 1503-1514.
- Okamoto, H., N. Takuwa, K. Gonda, H. Okazaki, K. Chang, Y. Yatomi, H. Shigematsu et Y. Takuwa. 1998. «EDG1 is a functional sphingosine-1-phosphate receptor that is linked via a Gi/o to multiple signaling pathways, including phospholipase C activation, Ca²⁺ mobilization, Ras-mitogen-activated protein kinase activation, and adenylate cyclase inhibition». *J Biol Chem*, vol. 273, no 42, p. 27104-27110.
- Okamoto, H., N. Takuwa, Y. Yatomi, K. Gonda, H. Shigematsu et Y. Takuwa. 1999. «EDG3 is a functional receptor specific for sphingosine 1-phosphate and sphingosylphosphorylcholine with signaling characteristics distinct from EDG1 and AGR16». *Biochem Biophys Res Commun*, vol. 260, no 1, p. 203-208.
- Okamoto, H., N. Takuwa, T. Yokomizo, N. Sugimoto, S. Sakurada, H. Shigematsu et Y. Takuwa. 2000. «Inhibitory regulation of Rac activation, membrane ruffling, and cell

migration by the G protein-coupled sphingosine-1-phosphate receptor EDG5 but not EDG1 or EDG3». *Mol Cell Biol*, vol. 20, no 24, p. 9247-9261.

- Oliveira, P. A., A. Colaco, R. Chaves, H. Guedes-Pinto, P. Lf De-La-Cruz et C. Lopes. 2007. «Chemical carcinogenesis». *An Acad Bras Cienc*, vol. 79, no 4, p. 593-616.
- Olivera, A., et S. Spiegel. 1993. «Sphingosine-1-phosphate as second messenger in cell proliferation induced by PDGF and FCS mitogens». *Nature*, vol. 365, no 6446, p. 557-560.
- Ono, K., et J. Han. 2000. «The p38 signal transduction pathway: activation and function». *Cell Signal*, vol. 12, no 1, p. 1-13.
- Oskeritzian, C. A., S. Milstien et S. Spiegel. 2007. «Sphingosine-1-phosphate in allergic responses, asthma and anaphylaxis». *Pharmacol Ther*, vol. 115, no 3, p. 390-399.
- Palazzo, A., R. Iacovelli et E. Cortesi. 2010. «Past, present and future of targeted therapy in solid tumors». *Curr Cancer Drug Targets*, vol. 10, no 5, p. 433-461.
- Pan, M. H., Y. S. Chiou, Y. J. Wang, C. T. Ho et J. K. Lin. 2011. «Multistage carcinogenesis process as molecular targets in cancer chemoprevention by epicatechin-3-gallate». *Food Funct*, vol. 2, no 2, p. 101-110.
- Pan, M. H., C. S. Lai et C. T. Ho. 2010. «Anti-inflammatory activity of natural dietary flavonoids». *Food Funct*, vol. 1, no 1, p. 15-31.
- Pandey, K. B., et S. I. Rizvi. 2009. «Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease». *Oxid Med Cell Longev*, vol. 2, no 5, p. 270-278.
- Panetti, T. S. 2002. «Differential effects of sphingosine 1-phosphate and lysophosphatidic acid on endothelial cells». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1582, no 1-3, p. 190-196.
- Patan, S. 2004. «Vasculogenesis and angiogenesis». *Cancer Treat Res*, vol. 117, p. 3-32.
- Pchejetski, D., M. Golzio, E. Bonhoure, C. Calvet, N. Doumerc, V. Garcia, C. Mazerolles, P. Rischmann, J. Teissie, B. Malavaud et O. Cuvillier. 2005. «Sphingosine kinase-1 as a chemotherapy sensor in prostate adenocarcinoma cell and mouse models». *Cancer Res*, vol. 65, no 24, p. 11667-11675.
- Perry, V. H., D. C. Anthony, S. J. Bolton et H. C. Brown. 1997. «The blood-brain barrier and the inflammatory response». *Mol Med Today*, vol. 3, no 8, p. 335-341.
- Persidsky, Y. 1999. «Model systems for studies of leukocyte migration across the blood - brain barrier». *J Neurovirol*, vol. 5, no 6, p. 579-590.

- Piani, D., M. Spranger, K. Frei, A. Schaffner et A. Fontana. 1992. «Macrophage-induced cytotoxicity of N-methyl-D-aspartate receptor positive neurons involves excitatory amino acids rather than reactive oxygen intermediates and cytokines». *Eur J Immunol*, vol. 22, no 9, p. 2429-2436.
- Pombo, C. M., J. V. Bonventre, J. Avruch, J. R. Woodgett, J. M. Kyriakis et T. Force. 1994. «The stress-activated protein kinases are major c-Jun amino-terminal kinases activated by ischemia and reperfusion»: *J Biol Chem*, vol. 269, no 42, p. 26546-26551.
- Prasad, S., K. Phromnoi, V. R. Yadav, M. M. Chaturvedi et B. B. Aggarwal. 2010. «Targeting inflammatory pathways by flavonoids for prevention and treatment of cancer». *Planta Med*, vol. 76, no 11, p. 1044-1063.
- Qi, M., et E. A. Elion. 2005. «MAP kinase pathways». *J Cell Sci*, vol. 118, no Pt 16, p. 3569-3572.
- Qin, L., X. Wu, M. L. Block, Y. Liu, G. R. Breese, J. S. Hong, D. J. Knapp et F. T. Crews. 2007. «Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration». *Glia*, vol. 55, no 5, p. 453-462.
- Raff, M. C. 1996. «Size control: the regulation of cell numbers in animal development». *Cell*, vol. 86, no 2, p. 173-175.
- Ransohoff, R. M., et M. A. Brown. 2012. «Innate immunity in the central nervous system». *J Clin Invest*, vol. 122, no 4, p. 1164-1171.
- Risau, W. 1998a. «Angiogenesis is coming of age». *Circ Res*, vol. 82, no 8, p. 926-928.
- , 1998b. «Development and differentiation of endothelium». *Kidney Int Suppl*, vol. 67, p. S3-6.
- Rivera, J., R. L. Proia et A. Olivera. 2008. «The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity». *Nat Rev Immunol*, vol. 8, no 10, p. 753-763.
- Rolle, C. E., S. Sengupta et M. S. Lesniak. 2012. «Mechanisms of immune evasion by gliomas». *Adv Exp Med Biol*, vol. 746, p. 53-76.
- Rosen, H., et E. J. Goetzl. 2005. «Sphingosine 1-phosphate and its receptors: an autocrine and paracrine network». *Nat Rev Immunol*, vol. 5, no 7, p. 560-570.
- Roux, P. P., et J. Blenis. 2004. «ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions». *Microbiol Mol Biol Rev*, vol. 68, no 2, p. 320-344.

- Sabbadini, R. A. 2006. «Targeting sphingosine-1-phosphate for cancer therapy». *Br J Cancer*, vol. 95, no 9, p. 1131-1135.
- Sagar, S. M., D. Yance et R. K. Wong. 2006. «Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 2». *Curr Oncol*, vol. 13, no 3, p. 99-107.
- Samson, Michel, Florence Aubry et Marc Parmentier. 1999. «Que sont les chimiokines ?». *médecine/sciences*, vol. 15, p. 966-973.
- Sanchez, T., et T. Hla. 2004. «Structural and functional characteristics of S1P receptors». *J Cell Biochem*, vol. 92, no 5, p. 913-922.
- Savinov, A. Y., et A. Y. Strongin. 2013. «Targeting the T-cell membrane type-1 matrix metalloproteinase-CD44 axis in a transferred type 1 diabetes model in NOD mice». *Exp Ther Med*, vol. 5, no 2, p. 438-442.
- Sawai, H., et Y. A. Hannun. 1999. «Ceramide and sphingomyelinases in the regulation of stress responses». *Chem Phys Lipids*, vol. 102, no 1-2, p. 141-147. En ligne. <http>.
- Schenkel, A. R., Z. Mamdouh et W. A. Muller. 2004. «Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation». *Nat Immunol*, vol. 5, no 4, p. 393-400.
- Schetter, A. J., N. H. Heegaard et C. C. Harris. 2010. «Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways». *Carcinogenesis*, vol. 31, no 1, p. 37-49.
- Schlessinger, J. 2000. «Cell signaling by receptor tyrosine kinases». *Cell*, vol. 103, no 2, p. 211-225.
- Schwab, S. R., et J. G. Cyster. 2007. «Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs». *Nat Immunol*, vol. 8, no 12, p. 1295-1301.
- Seidel, G., K. Bocker, J. Schulte, C. Wewer, L. Greune, V. Humberg et M. A. Schmidt. 2011. «Pertussis toxin permeabilization enhances the traversal of Escherichia coli K1, macrophages, and monocytes in a cerebral endothelial barrier model in vitro». *Int J Med Microbiol*, vol. 301, no 3, p. 204-212.
- Sellebjerg, F., et T. L. Sorensen. 2003. «Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system». *Brain Res Bull*, vol. 61, no 3, p. 347-355.
- Shacter, E., et S. A. Weitzman. 2002. «Chronic inflammation and cancer». *Oncology (Williston Park)*, vol. 16, no 2, p. 217-226, 229; discussion 230-212.

- Shubik, P. 1982. «Vascularization of tumors: a review». *J Cancer Res Clin Oncol*, vol. 103, no 3, p. 211-226.
- Spiegel, S., et S. Milstien. 2002. «Sphingosine 1-phosphate, a key cell signaling molecule». *J Biol Chem*, vol. 277, no 29, p. 25851-25854.
- , 2003. «Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid». *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 4, no 5, p. 397-407.
- Springer, T. A. 1994. «Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm». *Cell*, vol. 76, no 2, p. 301-314.
- Stoll, G., et S. Jander. 1999. «The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS». *Prog Neurobiol*, vol. 58, no 3, p. 233-247.
- Stratton, M. R., P. J. Campbell et P. A. Futreal. 2009. «The cancer genome». *Nature*, vol. 458, no 7239, p. 719-724.
- Streit, W. J., S. A. Walter et N. A. Pennell. 1999. «Reactive microgliosis». *Prog Neurobiol*, vol. 57, no 6, p. 563-581.
- Tachibana, H. 2009. «Molecular basis for cancer chemoprevention by green tea polyphenol EGCG». *Forum Nutr*, vol. 61, p. 156-169.
- Tafani, M., M. Di Vito, A. Frati, L. Pellegrini, E. De Santis, G. Sette, A. Eramo, P. Sale, E. Mari, A. Santoro, A. Raco, M. Salvati, R. De Maria et M. A. Russo. 2011. «Pro-inflammatory gene expression in solid glioblastoma microenvironment and in hypoxic stem cells from human glioblastoma». *J Neuroinflammation*, vol. 8, p. 32.
- Taha, T. A., K. M. Argraves et L. M. Obeid. 2004. «Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1682, no 1-3, p. 48-55.
- Tan, Y., J. Rouse, A. Zhang, S. Cariaty, P. Cohen et M. J. Comb. 1996. «FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2». *EMBO J*, vol. 15, no 17, p. 4629-4642.
- Thissen, J.-P. 2007. *Traité de nutrition artificielle de l'adulte*. 203-214: p.
- Thun, M. J., S. J. Henley et C. Patrono. 2002. «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: mechanistic, pharmacologic, and clinical issues». *J Natl Cancer Inst*, vol. 94, no 4, p. 252-266.
- Toman, R. E., et S. Spiegel. 2002. «Lysophospholipid receptors in the nervous system». *Neurochem Res*, vol. 27, no 7-8, p. 619-627.

- Törnquist, Kid. 2013. «Sphingosine 1-Phosphate and Cancer: Lessons from Thyroid Cancer Cells». *Biomolecules*, no 3, p. 303-315.
- Trippier, P. C., K. Jansen Labby, D. D. Hawker, J. J. Mataka et R. B. Silverman. 2013. «Target- and mechanism-based therapeutics for neurodegenerative diseases: strength in numbers». *J Med Chem*, vol. 56, no 8, p. 3121-3147.
- Umeda, D., S. Yano, K. Yamada et H. Tachibana. 2008. «Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate signaling pathway through 67-kDa laminin receptor». *J Biol Chem*, vol. 283, no 6, p. 3050-3058.
- Van Brocklyn, J., C. Letterle, P. Snyder et T. Prior. 2002. «Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase beta». *Cancer Lett*, vol. 181, no 2, p. 195-204.
- Van Brocklyn, J. R., C. A. Jackson, D. K. Pearl, M. S. Kotur, P. J. Snyder et T. W. Prior. 2005. «Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines». *J Neuropathol Exp Neurol*, vol. 64, no 8, p. 695-705.
- Vezina, A., R. Chokor et B. Annabi. 2012. «EGCG targeting efficacy of NF-kappaB downstream gene products is dictated by the monocytic/macrophagic differentiation status of promyelocytic leukemia cells». *Cancer Immunol Immunother*, vol. 61, no 12, p. 2321-2331.
- Weigert, A., N. Weis et B. Brune. 2009. «Regulation of macrophage function by sphingosine-1-phosphate». *Immunobiology*, vol. 214, no 9-10, p. 748-760.
- Weisburger, J. H. 1999. «Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now». *Mutat Res*, vol. 437, no 2, p. 105-112.
- Williams, G. M. 2001. «Mechanisms of chemical carcinogenesis and application to human cancer risk assessment». *Toxicology*, vol. 166, no 1-2, p. 3-10.
- Williams, K., X. Alvarez et A. A. Lackner. 2001. «Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system». *Glia*, vol. 36, no 2, p. 156-164.
- Wolburg, H., K. Wolburg-Buchholz et B. Engelhardt. 2005. «Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact». *Acta Neuropathol*, vol. 109, no 2, p. 181-190.
- Wu, Han-Chung, Chia-Ting Huang et De-Kuan Chang. 2008. «Anti-Angiogenic Therapeutic Drugs for Treatment of Human Cancer». *Cancer Mol*, vol. 4, p. 37-45.

- Yamakawa, S., T. Asai, T. Uchida, M. Matsukawa, T. Akizawa et N. Oku. 2004. «(-)-Epigallocatechin gallate inhibits membrane-type 1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP, and tumor angiogenesis». *Cancer Lett*, vol. 210, no 1, p. 47-55.
- Yatomi, Y., T. Ohmori, G. Rile, F. Kazama, H. Okamoto, T. Sano, K. Satoh, S. Kume, G. Tigyi, Y. Igarashi et Y. Ozaki. 2000. «Sphingosine 1-phosphate as a major bioactive lysophospholipid that is released from platelets and interacts with endothelial cells». *Blood*, vol. 96, no 10, p. 3431-3438.
- Yatomi, Y., Y. Ozaki, T. Ohmori et Y. Igarashi. 2001. «Sphingosine 1-phosphate: synthesis and release». *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, vol. 64, no 1-4, p. 107-122.
- Yatomi, Y., S. Yamamura, N. Hisano, K. Nakahara, Y. Igarashi et Y. Ozaki. 2004. «Sphingosine 1-phosphate breakdown in platelets». *J Biochem*, vol. 136, no 4, p. 495-502.
- Young, N., et J. R. Van Brocklyn. 2007. «Roles of sphingosine-1-phosphate (S1P) receptors in malignant behavior of glioma cells. Differential effects of S1P2 on cell migration and invasiveness». *Exp Cell Res*, vol. 313, no 8, p. 1615-1627.
- Zaveri, N. T. 2006. «Green tea and its polyphenolic catechins: medicinal uses in cancer and noncancer applications». *Life Sci*, vol. 78, no 18, p. 2073-2080.
- Zgheib, A., S. Lamy et B. Annabi. 2013. «Epigallocatechin gallate targeting of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated Src and Janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3 signaling inhibits transcription of colony-stimulating factors 2 and 3 in mesenchymal stromal cells». *J Biol Chem*, vol. 288, no 19, p. 13378-13386.
- Zhang, Z., Z. Y. Zhang, U. Fauser et H. J. Schluesener. 2008. «FTY720 ameliorates experimental autoimmune neuritis by inhibition of lymphocyte and monocyte infiltration into peripheral nerves». *Exp Neurol*, vol. 210, no 2, p. 681-690.